



Hembras hetero y homogaméticas en el roedor cricétido *Akodon azarae* : Su desempeño reproductivo y mantenimiento en condiciones de laboratorio

Espinosa, María Beatriz
1991

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Registro N° 2431.

HEMBRAS HETERO Y HOMOGAMETICAS EN EL ROEDOR CRICETIDO
Akodon azarae: SU DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y MANTENIMIENTO
EN CONDICIONES DE LABORATORIO

MARIA BEATRIZ ESPINOSA

1991

Tesis.
2431.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HEMBRAS HETERO Y HOMOGAMETICAS EN EL ROEDOR CRICETIDO Akodon
azarae: SU DESEMPEÑO REPRODUCTIVO Y MANTENIMIENTO
EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

MARIA BEATRIZ ESPINOSA

Centro de Investigaciones en Reproducción,
Facultad de Medicina (UBA).

Directora de Tesis: Doctora María Susana Merani.

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas.

1991

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a muchos colegas y amigos que me han ayudado, directa o indirectamente a relizar este trabajo.

A la Doctora M. Susana Merani por la enseñanza y orientación en el desarrollo del trabajo, pero sobre todo por brindarme la necesaria libertad y conocimientos aportados sobre el modelo experimental.

Al Doctor Alberto J. Solari por sus críticas e importantes conocimientos aportados al tema desarrollado.

Al Doctor Osvaldo A. Reig a quien le debo mi gratitud por haber encaminado enriquecedoramente mis primeros pasos en la investigación científica.

A María Avila, Andrea Ayma y Cristina Cerqueiro que con muchísima paciencia me posibilitaron el uso incondicional de la IBM, y a todos los demás compañeros del "piso 11" con los que compartí largas horas de trabajo.

A todos mis ex-compañeros de trabajo del GIBE por su constante estímulo.

A quienes lo han hecho a través de fértiles discusiones y charlas trasnochadas, con su directa y desinteresada colaboración, mis amigos Victor Cussac, Patricia Bernninsone, Vida Hodara y Alfredo Vitullo quienes me alentaron en buena parte del trabajo cotidiano aportándome constante estímulo y muchas horas de su tiempo.

A las instituciones que de un modo u otro permitieron que este trabajo se desarrollara: el CONICET y la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

"Hemos heredado de nuestros antepasados el anhelo profundo de un conocimiento unificado y universal. El mismo nombre, dado a las más altas instituciones de enseñanza, nos recuerda que, desde la Antigüedad y a través de los siglos, el aspecto **universal** de la ciencia ha sido el único que ha merecido un crédito absoluto. Pero la propagación, tanto en profundidad como en amplitud, de las múltiples ramas del conocimiento humano durante los últimos cien años nos ha enfrentado con un singular dilema. Por un lado, sentimos con claridad que sólo ahora estamos empezando a adquirir material de confianza para lograr soldar en un todo indiviso la suma de los conocimientos actuales. Pero, por el otro, se ha hecho poco menos que imposible para un solo cerebro dominar completamente más que una pequeña parte especializada del mismo."

Erwin Schrodinger

Dublin, setiembre de 1944.

A mis amigos

A mis hermanas

A mi padre

INDICE

CAPITULO 1

1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 Ubicación taxonómica de <i>Akodon azarae</i>	1
1.1.2 Reseña de la ecología de <i>Akodon azarae</i>	3
1.1.3 <i>Akodon azarae</i> : hembras con cromosomas sexuales heteromórficos.....	4
1.1.4 Mecanismos cromosómicos de determinación del sexo...	9
1.1.5 Mecanismos de determinación cromosómica del sexo en los mamíferos. 1) Sistemas de cromosomas sexuales múltiples. 2) Individuos con desvíos en la constitución cromosómica sexual en especies con cromosomas sexuales normales. 3) Especies con mecanismos cromosómicos peculiares de determinación del sexo.....	11
1.1.6 El comportamiento del par XY.....	21
1.1.7 La determinación del sexo en términos bioquímicos.....	22
1.1.8 <i>Akodon azarae</i> , un modelo para estudios de determinación cromosómica del sexo en mamíferos....	27
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30

CAPITULO 2.

2. LOS ANIMALES, SU CRIA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

2.1. MATERIALES Y METODOS

2.1.1	Establecimiento de la colonia.....	33
2.1.2	Condiciones ambientales.....	35
2.1.3	Alimentación y sanidad de los animales.....	37
2.1.4	Identificación de los animales y registro de los datos.....	38
2.1.5	Los apareamientos.....	42
2.1.6	Parámetros de crecimiento.....	43
2.1.7	Parámetros Reproductivos.....	43
2.1.8	Inducción de la ovulación.....	44
2.1.9	Ciclo estral.....	46
2.1.10	Estadística.....	48

2.2 RESULTADOS

2.2.1	Evaluación de la productividad de la colonia..	49
2.2.2	Tasa de ovulación normal.....	53
2.2.3	Inducción de la respuesta ovulatoria.....	54
2.2.4	Tamaño de camada.....	55
2.2.5	Proporción de sexos y mortalidad pre-destete..	56
2.2.6	Duración de la gestación y observaciones sobre ciclo estral.....	57

2.2.7 Presencia de estro post-parto y retraso en la implantación.....	59
2.2.8 Parámetros de crecimiento post-natal y edad del destete.....	62
2.2.9 Inicio y duración de la actividad reproductiva.....	64
2.2.10 Longevidad de <i>A. azarae</i> en condiciones de laboratorio.....	65
2.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES.....	71

CAPITULO 3

3. BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE HEMBRAS XX Y Xx

3.1 MATERIALES Y METODOS.....	77
3.2 RESULTADOS.....	79
3.2.1 Media de camada.....	79
3.2.2 Proporción de sexos.....	80
3.2.3 Mortalidad pre-destete.....	87
3.2.4 Edad al primer parto.....	88
3.2.5 Edad al último parto.....	90
3.2.6 Número de camadas producidas por hembra.....	92
3.2.7 Intervalo entre partos.....	95
3.2.8 Fecundidad.....	98
3.2.9 Tasa de ovulación.....	102
3.2.10 Pérdida pre-natal.....	103
3.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES.....	106

CAPITULO 4

4. LINAJES DE HEMBRAS XX Y Xx

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1	Cromosomas de células somáticas.....	110
4.1.1.1	Neonatos.....	110
4.1.1.2	Adultos.....	112
4.1.1.3	Bandas G y C.....	113
4.1.2	Cromosomas de células germinales.....	114
4.1.2.1	Meiosis femenina.....	114

4.2 RESULTADOS

4.2.1	Los cromosomas de Akodon azarae	117
4.2.2	Rendimiento de la técnica de biopsia hepática.....	121
4.2.3	Análisis de los cromosomas sexuales.....	122
4.2.4	Proporción de hembras XX y Xx en la descendencia de hembras Xx.....	125
4.2.5	Estudios citogenéticos en hembras provenientes de campo.....	126
4.2.6	Resultados de la meiosis en las hembras....	128

4.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES.....132

5 DISCUSION.....135

6 BIBLIOGRAFIA.....152

CAPITULO 1

1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1. UBICACION TAXONOMICA DE *Akodon azarae*

Aproximadamente el 43 % de las especies de mamíferos que habitan actualmente el continente sudamericano, pertenecen al orden de los roedores que constituyen cerca de 450 especies vivientes.

La familia más conspicua del orden, Cricetidae, agrupa el 55% de las especies de roedores sudamericanos (22% de las especies de mamíferos del continente). En su gran mayoría los cricétidos sudamericanos están incluidos en la subfamilia Sigmodontinae (Reig, 1984).

La familia Cricetidae está constituida por dos subfamilias Sigmodontinae y Neotominae (Hershkovitz, 1966; Reig, 1980).

Una cepa cricetodontina (protosigmodontina invasora) del Oligoceno norteamericano, habría alcanzado el continente sudamericano por transporte pasivo (en la etapa en que ambos continentes se encontraban aislados), produciéndose la diversificación tribal y genérica de la subfamilia en América del Sur.

Los géneros vivientes de sigmodontinos se agrupan en siete tribus distintas con límites muy definidos. Estas representan ramas de una radiación adaptativa, que surgió como respuesta de la creciente especialización evolutiva para conquistar diferentes nichos ecológicos.

Dichas siete tribus de sigmodontinos, difieren mucho en su diversidad: aproximadamente el 87% de las especies vivientes pertenecen a tres tribus (Oryzomyini 44%, Akodontini 25% y Phyllotini 18%) (Reig, 1986). Estas tres tribus representan tres grados evolutivos sucesivos (Reig, 1981).

Los roedores akodontinos pueden haber derivado de antecesores oryzomyinos de acuerdo a la morfología y los datos cromosómicos.

La mayoría (80%) de las especies de akodontinos pertenecen a uno de los tres géneros politípicos: **Akodon**, **Oxymycterus** o **Bolomys**.

Las especies de **Akodon** viven en la puna, el páramo, la montaña tropical y las forestas subtropicales, las pampas herbosas y hasta en los fríos Andes del sur (Reig, 1986; 1987).

La distribución conocida para **Akodon azarae** corresponde a las llanuras pampásicas de la Argentina y del Uruguay, donde se los encuentra generalmente asociados a los campos de cultivo.

1.1.2 RESEÑA DE LA ECOLOGIA DE **Akodon azarae**

Akodon azarae es la especie más común en el conjunto de pequeños roedores cricétidos de los pastizales pampeanos. La distribución geográfica de este roedor es muy amplia (en la Argentina incluye las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes y Chaco así como Uruguay y el sudeste de Brasil) y utiliza variados habitats como pastizales, campos de cultivo y sus bordes, terraplenes de los ferrocarriles etc. (Cabrera, 1961; Reig, 1964; Crespo, 1966; Barlow, 1969; Zuleta, 1989).

Las características poblacionales de la especie, tales como su demografía, el uso del espacio, la organización social, su reproducción y el parasitismo, fueron estudiados por Zuleta, 1989; Zuleta et al., 1988; 1990.

Las primeras investigaciones acerca de la composición por edades, longevidad y dinámica reproductiva, fueron las realizadas por Pearson (1967) en una población de **A. azarae** de la zona de

Núñez -Provincia de Buenos Aires- (éstas fueron las primeras investigaciones de esta índole realizadas en ratones de campo de América del Sur).

La heterogeneidad ambiental y la estacionalidad de la región pampeana son los factores que determinan la ecología de *A. azarae*.

En relación a los demás cricétidos *A. azarae*, cuyo nombre común más apropiado es "ratón de pastizal pampeano" (Zuleta et al., 1988) es la especie clave en el conjunto de cricétidos pampeanos.

1.1.3. *Akodon azarae*: HEMBRAS CON CROMOSOMAS SEXUALES HETEROMORFICOS.

La citogenética de los roedores akodontinos ha sido extensamente estudiada (una revisión se encuentra en Bianchi & Merani, 1984). Algunos géneros son invariables, pero en otros, como por ejemplo *Akodon*, se ha encontrado una gran variación tanto en número como en morfología cromosómica (Bianchi et al., 1969; Bianchi et al. 1976; Bianchi et al. 1979; Bianchi & Merani, 1980; Gallardo, 1982; Liascovich, 1991; Liascovich & Reig, 1989; Liascovich et al., 1989; Reig et al., 1971; Rodríguez et al. 1983; Yonenaga, 1979; Vitullo et al., 1986).

Además de **Dicrostonyx** y **Myopus** ha sido propuesto **Akodon** como el género que tiene más especies candidatas a presentar hembras XY. Se las ha propuesto debido a que todas ellas presentan gran variabilidad en la forma y tamaño de sus cromosomas X y por el hecho de que algunas hembras tienen cromosomas sexuales indistinguibles de los del macho.

A. mollis es la especie donde la presencia de hembras XY se ha documentado más firmemente (Lobato et al., 1982).

En otras especies de **Akodon**, **A. azarae**, **A. varius** y **A. boliviensis** (Bianchi et al., 1971), como también **A. neocenus** y **A. alterus** (Apfelbaum et al., 1988; Liascovich, 1991) el cromosoma Y del macho y el cromosoma tipo Y de algunas hembras son indistinguibles.

Sin embargo, el pequeño tamaño de este cromosoma que presenta bandeo C positivo, ha impedido hasta ahora una comparación detallada con las técnicas usuales de la citogenética.

El cromosoma tipo Y de las hembras se ha interpretado como un cromosoma X con una gran deleción de brazo largo (Bianchi & Contreras, 1967; Bianchi et al., 1968).

La morfología y número cromosómico en **A. azarae** fue descripta en 1967 por Bianchi y Contreras.

El cromosoma $x(1)$ representa un cromosoma que dichos autores han interpretado originalmente como un cromosoma X que ha sufrido una gran delección de brazo largo.

Posteriormente describieron la existencia de hembras $2n=38$, $Xx(s)$ donde el $x(s)$ representa un cromosoma X con delección de brazo corto (Bianchi et al., 1968). Asimismo describen en esta oportunidad el área de cromatina sexual y el patrón de replicación de los cromosomas sexuales en *A. azarae*.

En síntesis, los trabajos pioneros donde se describen las características citogenéticas de *A. azarae* (Bianchi y Contreras, 1967; Bianchi et al., 1968) destacan la existencia de cinco tipos de hembras en relación a su cariotipo: hembras $2n=38$, XX; $2n=38$, $Xx(1)$; $2n=38$, $Xx(s)$; $2n=37$, XO y hembras mosaicos $2n=37/38$, $Xx(1)/XO$ (figura 1.1.3).

Mediante el análisis del patrón de bandas G en tres especies de *Akodon* (*A. molinae*, *A. azarae* y *A. obscurus*) encuentran que los cromosomas X e Y de dichas tres especies tienen muy poca correspondencia y proponen que dichos cromosomas son inestables y propensos a sufrir rearrreglos evolutivos (Bianchi et al., 1976).

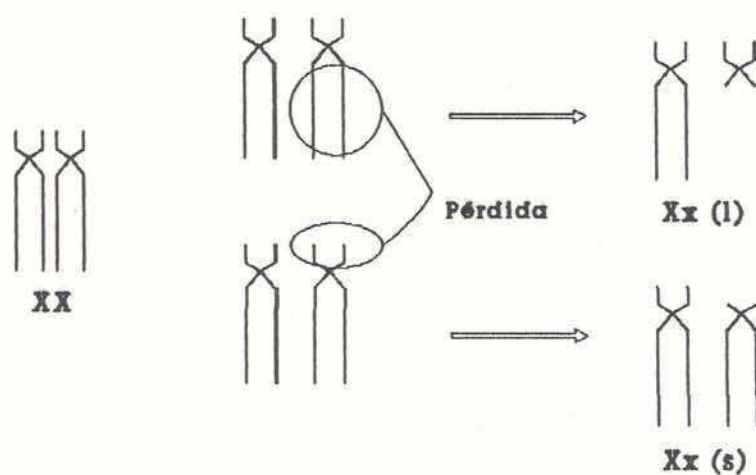
Actualmente hay argumentos provenientes de las técnicas de la biología molecular, en favor de la hipótesis XY para las hembras de *A. azarae*. Se han encontrado fragmentos que hibridizan con sondas del gen ZFY tanto en machos como en hembras Xx(1) (Bianchi et al., 1989) así como otras especies de *Akodon* que presentan "pseudogenes Zinc-finger" ligados al Y (Bianchi, en prensa).

También se ha estudiado en detalle el comportamiento en la meiosis de los cromosomas sexuales en *A. azarae*, lo cual abre interesantes perspectivas (Solari et al., 1989).

Figura 1.1.3.

COMPLEMENTO SEXUAL EN HEMBRAS A.AZARAE

ORIGEN DE LOS CROMOSOMAS ALTERADOS



Origen postulado para los cromosomas sexuales de las hembras de *Akodon azarae* (Bianchi & Contreras, 1967; Bianchi et al., 1968).

1.1.4 MECANISMOS CROMOSOMICOS DE DETERMINACION DEL SEXO

Uno de los principales problemas de la biología fue el misterio del nacimiento de individuos de distintos sexos. Los mitos atribuían esta diferencia a las fases de la luna, al momento del día en que tenía lugar la fecundación, a la dirección del viento y a otras supuestas causas similares. Cientos de hipótesis sobre la naturaleza de este fenómeno se hicieron en los siglos pasados, sobre todo en el siglo XIX.

Sólo recién después de la formulación de la Teoría Cromosómica de la Herencia pudo explicarse el problema, comprendiendo el proceso de la determinación del sexo, y por qué la mitad de los individuos nace de sexo masculino y la otra mitad de sexo femenino. Mendel ya había sugerido que la determinación del sexo podía seguir la misma segregación que otras características heredadas.

A partir de 1900 se hicieron una serie de descubrimientos en los que se estableció la asociación de la característica sexual con la presencia o ausencia de un determinado cromosoma. Wilson y Stevens en 1905 descubrieron citológicamente los cromosomas sexuales.

En algunos vertebrados inferiores, como los anfibios y los reptiles, los cromosomas sexuales no se han identificado citológicamente. Saez en 1936 ya postuló la inexistencia de cromosomas sexuales diferenciados en los anfibios (Saez & Cardoso, 1978).

En estos casos, donde no hay cromosomas sexuales reconocibles, hay homocigosis o heterocigosis con respecto a aquellos genes que determinan el sexo. La diferenciación del par de cromosomas sexuales (XY o ZW) en los vertebrados, ha tenido lugar como consecuencia de la acumulación paulatina en un determinado cromosoma de aquellos genes determinantes del sexo, de los caracteres sexuales secundarios y de la fecundidad (Saez y Cardoso, 1978). Los dos sistemas de determinación del sexo más ampliamente reconocidos corresponden a los casos en que los machos son heterogaméticos o las hembras son heterogaméticas. Hay dos factores que controlan la herencia del sexo en ambos sistemas: un sexo es heterocigota o heterogamético para el factor sexual y el otro sexo es homocigota para uno de estos factores. Para el sistema en el cual el macho es heterogamético se reserva la notación XX/XY y ZW/ZZ cuando es la hembra el sexo heterogamético (Bull, 1983 y 1985).

En casi todas las especies dioicas la determinación del sexo es genética, y es posible distinguir citológicamente machos de hembras porque presentan dimorfismo cromosómico en el par sexual.

Actualmente se ha abierto una interesante polémica en relación a los genes responsables de la determinación del sexo, a partir de los descubrimientos de Page, (1988); Page et al. (1987). La citogenética del sexo, en consecuencia, puede encararse desde una perspectiva evolutiva, y ser abordada en dos aspectos: la descripción básica de variedades y los procesos que conducen a la variación.

1.1.5 MECANISMOS DE DETERMINACION CROMOSOMICA DEL SEXO EN LOS MAMIFEROS

En los mamíferos la determinación cromosómica del sexo se fija en el momento de la fertilización y no está influida por factores ambientales. El mecanismo general es aquel en el cual el macho es el sexo heterogamético y la hembra el sexo homogamético, y sus cromosomas sexuales se denominan XY y XX respectivamente. Aunque los cromosomas sexuales tienen un tamaño variable en general el Y es pequeño y el X es de tamaño intermedio (5% - 6% de la longitud total del set haploide femenino) (Ohno et al., 1964).

Si bien el sistema XX, XY está ampliamente establecido entre los distintos órdenes de mamíferos, ocurren excepciones al mismo en distintos grupos de organismos. Estas excepciones o mecanismos inusuales de determinación cromosómica del sexo han sido objeto de diversos estudios debido a la importancia que ellos revisten para la comprensión del funcionamiento del mecanismo de determinación del sexo.

De las más de 4000 especies de mamíferos vivientes solamente algunas pocas presentan mecanismos cromosómicos sexuales que se apartan del usual XX y XY. Estas pueden agruparse en tres categorías (siguiendo a Fredga, 1988): 1) especies con sistemas de cromosomas sexuales múltiples; 2) especies con cromosomas sexuales normales en las que eventualmente aparecen individuos con constitución cromosómica sexual desviada; y 3) especies con

sexo en **Akodon azarae**.

1) SISTEMAS DE CROMOSOMAS SEXUALES MÚLTIPLES

autosoma.

Muntiacus muntjak y **Sorex araneus**, los machos tienen un cromosoma más que las hembras. Cuando el Y se ha translocado a un autosoma, el mecanismo se denomina $X_1 X_1 X_2 X_2$ para las hembras y $X_1 X_1 Y$ para los machos. El X_1 es el X original y el X_2 es el autosoma homólogo al cual se ha traslocado el Y. En especies de este grupo la hembra tiene un cromosoma más que el macho.

caso machos y hembras tienen el mismo número cromosómico. El

Hamster chino (*Crisetulus griseus*) es un ejemplo bien conocido de este grupo. Estos grupos de especies con cromosomas sexuales compuestos no presentan mayor interés desde el punto de vista de la determinación sexual, los cromosomas sexuales se distribuyen regularmente en la meiosis y se producen dos tipos de espermatozoides y un tipo de ovocitos.

2) INDIVIDUOS CON DESVIOS EN LA CONSTITUCION CROMOSOMICA SEXUAL EN ESPECIES CON CROMOSOMAS SEXUALES NORMALES

En varias especies de mamíferos, incluido el hombre, con cromosomas sexuales normales, se conocen individuos con constitución cromosómica sexual desviada. En la tabla 1.1.5 se enumeran las especies en las que se han observado individuos con desviaciones en la constitución cromosómica sexual (revisado por Fredga, 1988).

Las desviaciones más comunes conocidas entre los mamíferos son los mosaicos (estos se han encontrado en la musaraña común (XY/XYY), el gato (XY/XXY/XXYY), el caballo (XO/XYY) y el ganado vacuno (XY/XYY).

Tabla 1.1.5 (Datos tomados de Fredga, 1988).

Especie	Fenotipo					
	XXY	Macho XYY	XX	XO	Hembra XXX	XY
<i>Macropus eugenii</i>	*	.	.	*	.	.
<i>Sorex araneus</i>	*	(*)
<i>Macaca mulatta</i>	.	.	.	*	.	.
<i>Canis familiaris</i>	*	.	*	.	.	.
<i>Felis catus</i>	*	(*)	.	*	.	.
<i>Equus caballus</i>	(*)	(*)	.	*	*	*
<i>Sus scrofa</i>	*	.	*	*	.	.
<i>Bos taurus</i>	*	(*)	.	*	*	.
<i>Capra hircus</i>	.	.	*	.	.	.
<i>Ovis aries</i>	*	.	.	*	.	.
<i>Akodon azarae</i>	.	.	.	*	.	.
<i>Cricetulus griseus</i>	*
<i>Bandicota bengalensis</i>	.	.	.	*	.	.
<i>Rattus rattus</i>	*	.	.	*	.	.
<i>Rattus norvegicus</i>	.	*
<i>Mus musculus</i>	*	*	*	*	.	*

Entre peréntesis se señalan los mosaicos.

El estudio de las características fenotípicas de las estructuras de los órganos reproductores, de la manifestación de los caracteres sexuales secundarios, de la fertilidad, etc., en estos individuos con cromosomas sexuales desviados, brinda importante información respecto de la influencia del mecanismo de determinación sexual cromosómica.

La constitución XO siempre da un fenotipo femenino y en relación a la fertilidad hay diferencias entre las especies grandes y las especies pequeñas. Los individuos XO de las especies de mamíferos grandes (con un lapso generacional largo) son infértiles, mientras que los individuos XO de los pequeños

mamíferos son hembras fértiles. La vida reproductiva está reducida debido al agotamiento prematuro de los ovocitos. La diferencia importante entre el ratón XO y la mujer XO se debe al menos en parte a una escala de tiempo: el ratón XO llega a la pubertad antes de que los efectos cuantitativos de la univalencia del X se reflejen en una población de ovocitos muy disminuida. En la mujer la pubertad se produce cuando ya casi o todos los ovocitos han degenerado (Lyon & Hawker, 1973; Burgoyne & Biggers, 1976).

También hay especies en las que se han encontrado individuos con constitución cromosómica equivocada en relación a su sexo fenotípico. Se encontraron machos XX entre los perros (Selden et al., 1978), los cerdos (Breeuwsma, 1970), las cabras (Hamerton et al., 1969) y los ratones. Diferentes causas genéticas producen la discrepancia en cada una de las especies.

Una de las explicaciones plausibles es que parte del cromosoma Y se haya translocado al X, particularmente la región determinante de testículos (TDF). Son muy bien conocidos los machos XX^{sxr} ("sex reversal") en *Mus musculus* en los que el fenotipo es masculino pero son estériles. También se han descrito hembras XY en caballos los que revisten particular interés porque el síndrome XY sexo revertido, se caracteriza tanto por heterogeneidad genotípica como fenotípica. El espectro fenotípico de hembras XY tiene en los mamíferos un rango que va desde hembras aproximadamente normales a yeguas masculinizadas (Kent et al. 1988).

3) ESPECIES CON MECANISMOS CROMOSOMICOS PECULIARES DE DETERMINACION DEL SEXO.

Estos mecanismos no provienen de la translocación a autosomas sino que incluyen alteraciones al sistema XX/XY asociadas a la pérdida de segmentos o cromosomas sexuales enteros y/o alteraciones génicas propias de los grupos de ligamiento sexual.

Se conocen varias especies que presentan mecanismos cromosómicos sexuales anómalos. Todas estas especies son roedores y en todos estos casos se encuentran, con frecuencias significativas en poblaciones naturales, individuos cuya constitución cromosómica sexual no es usual entre los mamíferos.

En roedores la presencia de dos cromosomas X no parece ser necesaria para la supervivencia y fertilidad de las hembras aunque la fertilidad pueda estar algo dañada.

Se ha descrito un mosaico gonosómico en *Microtus oregoni* donde los machos son XY en sus células somáticas e YO en sus células germinales, las hembras son XO en sus células somáticas y XX en las germinales (Matthey, 1958; Ohno et al. 1963; Ohno et al. 1966).

Por otro lado *Ellobius lutescens* y *Tokudaia osimensis* tienen un cariotipo XO tanto en las hembras como en los machos, sin ninguna diferencia citogenética aparente en el cariotipo de ambos sexos. En estas especies el modo de determinación sexual es aún motivo de debate (Vogel et al., 1988).

En **Nesokia indica**, de Delhi, India, los cromosomas X e Y muestran una gran variación en tamaño y morfología. Los cariotipos de algunas hembras no se pueden diferenciar (sin técnicas de bandeo cromosómico) de los cariotipos predominantes en los machos. Fredga en 1983 adelantó la posibilidad de que en esta especie pudieran existir hembras XY pero mediante la técnica de bandeo C de los cromosomas de **Nesokia indica** se encontró que la variación en tamaño y morfología de los cromosomas sexuales se debe a diferencias en la cantidad y distribución de la heterocromatina constitutiva. Así es que, aunque se sospechó que podían existir hembras XY en esta especie, la hipótesis fue finalmente descartada (Rao et al., 1983).

Dos géneros de lemmings son bien conocidos porque presentan hembras XY y XO, **Myopus** y **Dicrostonyx**, en ambos el mecanismo de determinación sexual es similar.

Entre las hembras de **Myopus** existen tres tipos cromosómicos llamados XX, X*Y y X*X*; los machos son XY. El asterisco designa una mutación ligada al X que afecta la interacción de los genes determinantes del sexo de tal manera que los individuos cuya constitución cromosómica sexual es X*Y son hembras. Los dos tipos de cromosoma X, el X* y el X pueden diferenciarse por el patrón de bandas G de sus brazos cortos. El brazo corto del X* es alrededor del 7% más pequeño que el del X (lo que corresponde a unas 1000 kilobases de ADN).

El cromosoma Y de **Myopus schisticolor** es heterocromático y se puede distinguir fácilmente después del bandeo (C o G). No hay

diferencias citogenéticamente detectables entre el Y de los machos y el de las hembras X*Y.

Todas las poblaciones que se conocen de **Myopus** tienen hembras X*Y y aparentemente el mismo mecanismo de determinación del sexo (Herbst et al. 1978; Fredga et al. 1976).

En **Dicrostonyx** el otro género de lemmings en el que se sospecha la presencia de hembras XY, la situación es diferente. Los dos tipos de cromosoma X no se pueden distinguir citológicamente y en este género (específicamente en **Dicrostonyx torquatus**) tampoco hay un cromosoma Y distinguible fácilmente.

Se han estudiado varias razas y subespecies de **Dicrostonyx** en las que la constitución cromosómica es compleja debido probablemente a una serie de translocaciones de autosomas a los cromosomas sexuales originales. Además presentan un número variable de cromosomas B lo que ha complicado la elucidación de la constitución cromosómica sexual (Gileva, 1983; Malcolm et al., 1986).

Entre los autores que han estudiado el género **Dicrostonyx** desde el punto de vista de la determinación cromosómica del sexo hay ciertas discrepancias. Mientras Fredga (1988) afirma la existencia de hembras XY, Gileva et al. (1982) consideran que en **Dicrostonyx** hay hembras XO y hembras XX, mientras que los machos son todos XO.

Estos autores postulan que el sexo de los animales XO depende de un factor genético ligado al X que dispone de dos formas alternativas denominadas "m" y "f". El factor "m-f" sería

un gen con dos alelos; la forma "f" habría perdido la habilidad de actuar como determinante masculino mientras que la forma "m" la habría conservado. Así los machos (XO) todos presentan el alelo "m", X^mO; las hembras XX serían homocigotas o heterocigotas para ambos alelos.

La discrepancia fundamental en la posición de unos y otros autores reside en el planteo evolutivo del origen de las hembras XO o XY. Porque más que un evento mutacional habría sido necesario el establecimiento del sistema genético determinando la aparición de hembras XO en **Dicrostonyx**.

Es posible que la mutación "f" haya aparecido en el antecesor común de ambos lemmings (**Dicrostonyx** y **Myopus**) y la pérdida del cromosoma Y en machos y el desarrollo de hembras XO podrían considerarse eventos subsecuentes a la mutación "f".

Sin embargo es de destacar que **Dicrostonyx** y **Myopus** tienen un mecanismo de determinación sexual que depende de una mutación ligada al X.

Otras especies de lemmings relacionadas, **Lemus** y **Synaptomys** presentan cromosomas sexuales ordinarios XX y XY, si bien las relaciones de parentesco entre **Myopus**, **Lemus** y **Synaptomys** no son del todo claras, bajo la presunción de considerar las relaciones de parentesco filogenético más estrecho entre **Myopus** y **Lemus** y **Synaptomys** (Fredga, 1988) se ha postulado que habrían ocurrido mutaciones con efectos similares en dos oportunidades separadas y se establecerían en poblaciones de **Myopus** y **Dicrostonyx**.

El sistema de compensación de dosis para genes ligados al X en los mamíferos (Lyon, 1961) provee una solución para explicar la potencial supervivencia de hembras con un sólo cromosoma X.

Pero no todas las apariciones espontáneas de hembras XO o XY en especies de mamíferos son fértiles o fenotípicamente normales.

La inactivación de uno de los dos X en las hembras de los mamíferos no es absoluta puesto que ambos X están activos en ciertos estadios de la ovogénesis y tempranamente en la embriogénesis (Monk & McLaren, 1981). Por esta razón, presumiblemente, las hembras XO en humanos, otros primates y ungulados son usualmente infértiles y poseen defectos fenotípicos.

1.1.6 EL COMPORTAMIENTO DEL PAR XY

En los mamíferos el par de cromosomas sexuales XY presenta un comportamiento cuyo aspecto más destacable es su condición heterocromática cuando se lo observa durante la meiosis masculina.

Este hecho fue observado incluso antes que se relacionaran los cromosomas sexuales con la determinación del sexo. Son vastas las investigaciones realizadas acerca del par XY, observado como cuerpo intranuclear o "vesícula sexual" que durante la meiosis de los espermatoцитos sufre cambios que permiten distinguir el par sexual del resto de los autosomas (Solari, 1974 y 1989).

Al comienzo de la meiosis, en leptotene el X y el Y no son totalmente heterocromáticos, pero en los estadios siguientes, los cromosomas sexuales forman una única masa heterocromática, el llamado cuerpo XY o "vesícula sexual". Durante el paquitene, que es el estadio más prolongado de la meiosis, el par sexual sufre varios cambios: al principio forman un sólo cuerpo y no presentan región nucleolar, en paquitene media desarrollan una región nucleolar en ratón y algunas otras especies; ya en paquitene tardío el cuerpo XY se observa marcadamente separado del resto de los autosomas. El cuerpo XY en diplotene puede observarse desplegado y fuertemente condensado mientras que en diacinesis ya pueden distinguirse muy claramente el elemento largo (cromosoma X) y el elemento corto (cromosoma Y) ambos con dos cromátides.

Durante la primera metafase, el par XY muestra el heteromorfismo clásico.

El par XY puede presentar relaciones nucleolares primarias (cuando el organizador nucleolar está en el X) o secundarias (cuando el organizador nucleolar está en autosomas). Las asociaciones primarias están restringidas a unas pocas especies, como el ratón, el hamster dorado y el hamster armenio mientras que las asociaciones secundarias pueden encontrarse más comunmente ya que es más bien una proximidad entre el nucleolo y el cuerpo XY.

1.1.7 LA DETERMINACION DEL SEXO EN TERMINOS BIOQUIMICOS

La búsqueda del factor determinante masculino en mamíferos ha conducido a la delimitación de una secuencia de ADN de 35 Kb que podría marcar el final de dicha búsqueda y el inicio del análisis genético de la determinación del sexo en mamíferos (Sinclair et al., 1990)

En 1959 se estableció por primera vez, para el hombre y el ratón, que el cromosoma Y era el determinante masculino (Jacobs & Strong, 1959). En 1966 se limitó la región determinante de masculinidad al brazo corto del Y. En 1984 a raíz del hallazgo de McLaren et al. de ratones macho que no presentaban antígeno específico de histocompatibilidad H-Y se abandonó la hipótesis

que durante más de 10 años sostuvo que el antígeno H-Y era el inductor testicular primario.

En diciembre de 1987 David Page y colaboradores informaron el descubrimiento de un gen "Zinc-Finger" presente en el cromosoma Y humano el que probablemente representaría el factor determinante de testículos (TDF) ligado al Y.

La identificación de este gen, ahora llamado ZFY prendió la mecha de una búsqueda predecible de los genes correspondientes en otros animales. Encontraron también otro gen estrechamente vinculado al ZFY en el cromosoma X al que denominaron ZFX.

En varios mamíferos eutherios estos genes están conservados en alto grado. En cambio en los marsupiales las secuencias vinculadas más estrechamente al ZFY están en autosomas, no en el cromosoma Y (Sinclair et al., 1988). Estos descubrimientos resultaron inquietantes, ya que en marsupiales, aún más que en eutherios, el cromosoma Y es determinante de masculinidad y por lo tanto es esperable que porte el equivalente del TDF.

Si el ZFY es autosómico en marsupiales, no puede ser el determinante masculino primario, tal como parecería serlo en otros mamíferos. Estos hallazgos plantearon el interrogante de si realmente el ZFY es el factor determinante de testículos (sin embargo podría ser que el ZFY sea el TDF en eutherios, mientras que en marsupiales algún otro factor juegue el rol primario).

El ZFY está altamente conservado y tiene una estructura consistente con una función regulatoria.

El cromosoma X de los marsupiales es más pequeño que el de los eutherios y no porta ninguna secuencia ZFX. En marsupiales varios de los genes conservados en el X de los eutherios están localizados en autosomas. Esto sugiere que ha tenido lugar una translocación, evidencia de ello es el hecho de que un "probe" para el gen de la distrofia muscular (que en humanos está al lado del ZFX), hibridiza con el cromosoma 5 en canguros en el mismo intervalo donde está el ZFY (Sinclair et al., 1988).

Para la formación de testículos en humanos se requieren tanto el ZFX como el ZFY. Algunos embriones humanos femeninos XY tienen un defecto cromosómico en la región X 21, allí donde se localiza el ZFX (Berstein et al., 1980).

Una explicación posible de los resultados podría ser que, en eutherios, el ZFY potencia la expresión o acción del ZFX el cual por sí mismo (en XX o XO) no puede gatillar la formación de testículos. En marsupiales algún otro gen ligado al Y podría potenciar el gen autosómico que se podría llamar ZFA. El ZFA sería el determinante de testículos pero bajo una regulación primaria diferente.

Las diferencias evolutivas en la señal primaria de la determinación sexual tiene ya varios antecedentes. Por ejemplo, en el nematode *Caenorhabditis elegans*, la determinación sexual primaria se debe a la proporción de X / autosomas, también en *Drosophila*, y es posible alterar el sistema de varias formas por mutación de genes autosómicos de determinación sexual (Hodgkin, 1988).

En términos bioquímicos parecería que la pregunta a responder es qué es lo que regulan estos genes "Zinc-Fingers" que codificarían proteínas con múltiples "domains" en forma de dedos.

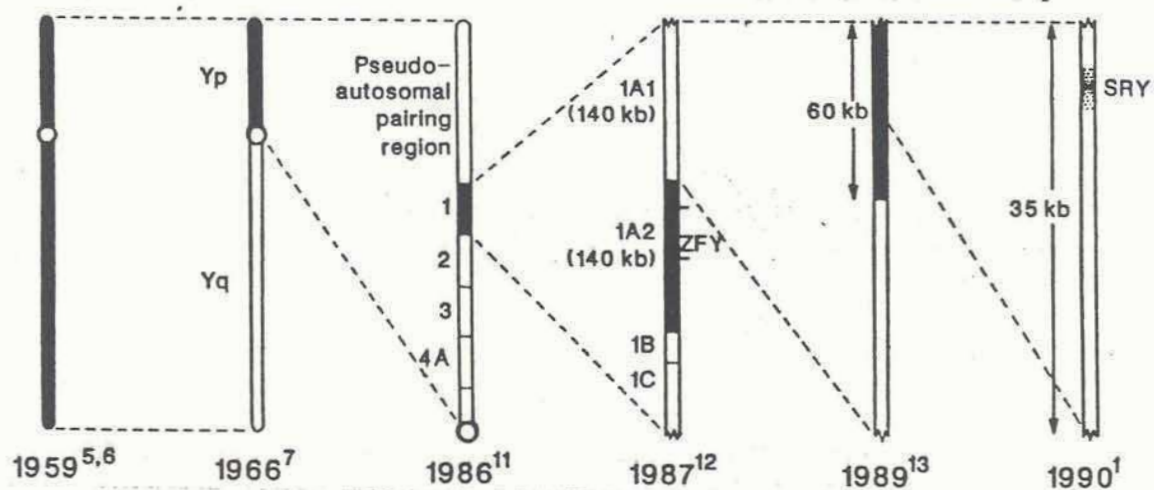
Si bien el gen ZFY resultaba ser un excelente candidato a ser el factor determinante de testículos, el hallazgo de tres hombres XX que no presentaban ZFY (Palmer et al., 1989) pero que eran hombres indudablemente, hizo que el gen ZFY fuera desplazado para adjudicarle la función TDF a una región del cromosoma Y de unas 140 Kb (1A1) (figura 1.1.7) que se había traslocado al X.

Paralelamente se estudió la expresión del ZFY homólogo de ratón y este probó estar asociado con las células germinales las que se cree no intervienen en la determinación de testículos (Koopman et al. 1989).

Finalmente sólo una secuencia de 35 Kb de ADN parece ser la responsable de la determinación de testículos. Este gen denominado SRY (sex-determining region of the Y) probablemente representa el comienzo de una cascada de genes regulatorios y su conocimiento conducirá a la comprensión del mecanismo de determinación del sexo en mamíferos (Gubbay et al. 1990; McLaren, 1990; Sinclair et al. 1990).

Figura 1.1.7.

Descubrimientos que condujeron a la identificación del gen SRY, región determinante del sexo en el cromosoma Y humano.



Tomada de McLaren, 1990.

1.1.8 *A. azarae*, UN MODELO PARA ESTUDIOS DE DETERMINACION CROMOSOMICA DEL SEXO EN MAMIFEROS.

Entre los mamíferos, los roedores son los animales más usados en condiciones de laboratorio debido al amplio conocimiento que se tiene de su biología, además de que entre otras cualidades presentan ciclos generacionales y reproductivos cortos. El roedor más usado como animal de laboratorio es *Mus musculus* con sus diferentes cepas, junto a ambas especies de *Rattus* (*R. norvegicus* y *R. rattus*).

Otras especies de roedores, como por ejemplo las del género *Peromyscus* se han estudiado en colonias de laboratorio y han sido útiles para responder nuevas preguntas.

Otros, como *Myopus schisticolor* o *Dicrostonyx torquatus* han demostrado ser buenos modelos, (para el estudio de los mecanismos de determinación del sexo en mamíferos) tanto en relación al significado evolutivo de la función reproductora como desde el punto de vista cromosómico de la determinación del sexo.

Sin embargo, pocas especies de cricétidos sudamericanos, especialmente de las que habitan en nuestro país, se han adaptado y mantienen bajo condiciones de laboratorio. Hay que destacar las especies de *Calomys*, como *C. laucha* y *C. musculinus* que han sido de gran utilidad para el estudio de la fiebre hemorrágica argentina (FHA) (Hodara, 1987; Sabbattini et al., 1977; Vitullo et al. 1987; Vitullo & Merani, 1988).

A. azarae, aunque también involucrado en los mecanismos de mantenimiento del virus Junin (agente etiológico de la FHA) resulta importante como modelo para estudios en determinación del sexo. Tiene además características que lo diferencian de los otros modelos de roedores utilizados para estudios de determinación sexual, por estar filogenéticamente muy poco emparentados.

Akodon, no solamente **A. azarae** sino también otras especies relacionadas del género, como **A. neocenus**, **A. boliviensis** y **A. alterus** que forman el mismo "cluster" con **A. azarae** (Liascovich, 1991) y probablemente presenten el mismo mecanismo de determinación sexual, proveerían un modelo diferente a los conocidos para responder las preguntas que se formulan acerca de los mecanismos de determinación del sexo y sus orígenes evolutivos.

Desde el punto de vista cromosómico, los siguientes hechos son de particular interés en conexión con el tema. La existencia de hembras fértiles homogaméticas y heterogaméticas en las poblaciones naturales, y también en las mantenidas en condiciones de cautiverio, permiten estudiar aspectos importantes en relación a la expresión de los genes determinantes del sexo.

El estudio detallado de los aspectos reproductivos de las hembras heterogaméticas en relación a las hembras homogaméticas, permiten interpretar la expresión de estos genotipos en relación a los modelos conocidos donde existen hembras XY (por ejemplo en **Myopus**), o donde se conocen hembras XO (por ejemplo en **Mus**).

Permitiendo delimitar en qué medida puede ser asimilada la especie *A. azarae* al modelo XY o al XO.

Desde el punto de vista genético poblacional, es de particular interés la interpretación del papel que puede tener en la naturaleza la presencia y mantenimiento de este mecanismo cromosómico de determinación del sexo. Lo cual resulta aún más interesante teniendo en cuenta que una consecuencia importante de dicho mecanismo es la determinación de la proporción sexual primaria.

Un conocimiento creciente acerca de la biología de esta especie se ha ido acumulando a lo largo de los últimos 23 años, pero lo que sabemos es aún poco en relación a lo que queda por saber.

A. azarae es una especie clave desde el punto de vista ecológico, y el conocimiento en profundidad de su biología reproductiva permite comprender cabalmente esta especie clave.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Como se ha mencionado **Akodon azarae** es una especie cuyo mecanismo de determinación del sexo es peculiar entre los mamíferos. Si bien esta especie ha sido objeto de estudio en colonias de laboratorio, se ha estudiado principalmente debido a su eventual vinculación con la infección por virus Junin (Carballal et al., 1988; De Villafañe, 1981).

La presente investigación tuvo como objetivos principales:

a-Estudiar los parámetros básicos de **Akodon azarae** en condiciones de laboratorio: crecimiento post-natal, longevidad, período de gestación, mortalidad predestete, y otras características de su reproducción.

b-Analizar los cromosomas sexuales, particularmente de las hembras, con la finalidad de establecer dos linajes para realizar cruzamientos dirigidos, por un lado hembras Xx y machos XY y por otro hembras XX y machos XY.

c-Determinar los efectos del heteromorfismo cromosómico de las hembras sobre la fertilidad y otros parámetros reproductivos delimitando la influencia de dicho mecanismo sobre la reproducción de esta especie en condiciones de cría en cautiverio.

d-Cuantificar el rendimiento reproductivo de las hembras heteromórficas en relación a las homomórficas, ambas mantenidas en condiciones de laboratorio, partiendo de la observación de la ausencia de individuos xY en esta especie.

Finalmente y partiendo de la hipótesis de que la segregación de los cromosomas sexuales de las hembras heteromórficas conduce a la formación de ovocitos portadores del cromosoma X y ovocitos portadores del cromosoma x, se analizó la meiosis femenina tanto en hembras heteromórficas como homomórficas para el par sexual.

Para el manejo y uso de los animales de experimentación durante la realización del presente trabajo se han observado y respetado las normas establecidas por el Canadian Council on Animal care..

CAPITULO 2

LOS ANIMALES, SU CRIA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

2.1. MATERIALES Y METODOS

2.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LA COLONIA

La colonia se estableció a partir de 7 hembras y 2 machos que fueron capturados en la localidad de Diego Gaynor (34° 10' S; 59° 14' W) en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

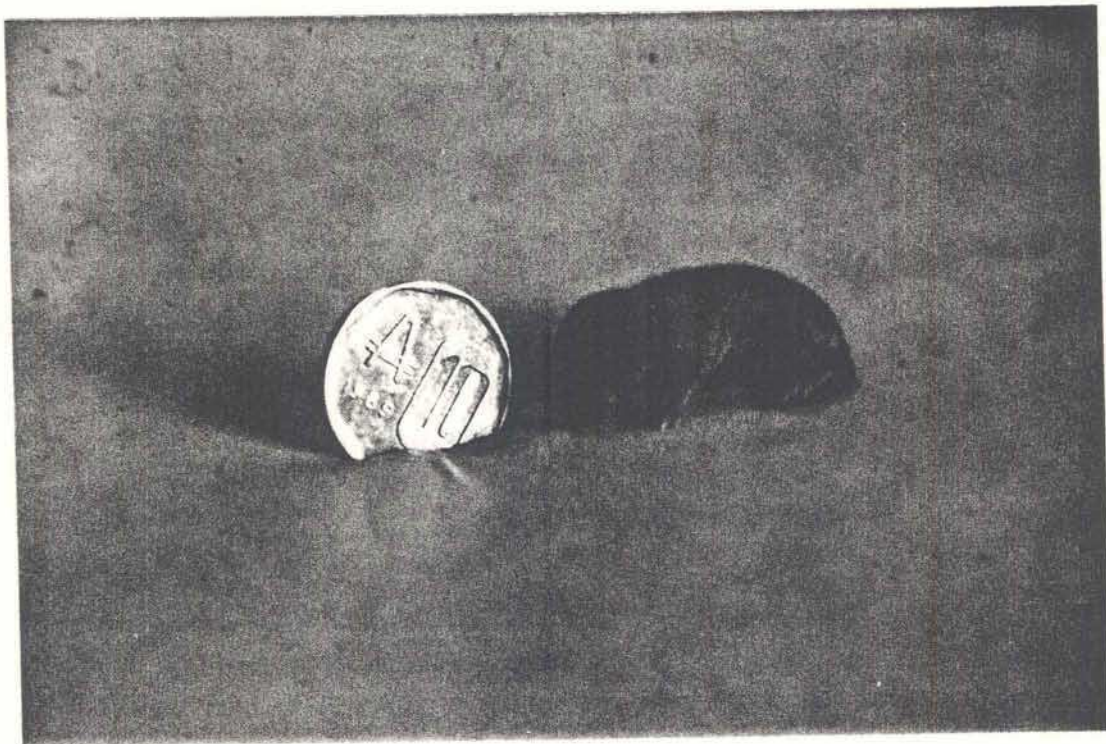
Dichos animales se introdujeron en el laboratorio en 1982, de ellos 4 hembras y 1 macho dejaron descendencia.

Posteriormente en 1986 se incorporaron una hembra y dos machos capturados en la misma localidad.

Hasta 1987 se mantuvo en el Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica. A mediados de 1987 los animales fueron trasladados a la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires donde se mantiene en la actualidad (Figura 2.1.1).

El procedimiento de cría se llevó a cabo siguiendo las condiciones para ratón de "The UFAW handbook on the care and management of Laboratory Animals" (1976).

Figura 2.1.1- ANIMALES ADULTOS Y JUVENILES *A. azarae* DE LA COLONIA DE LABORATORIO.



2.1.2. CONDICIONES AMBIENTALES

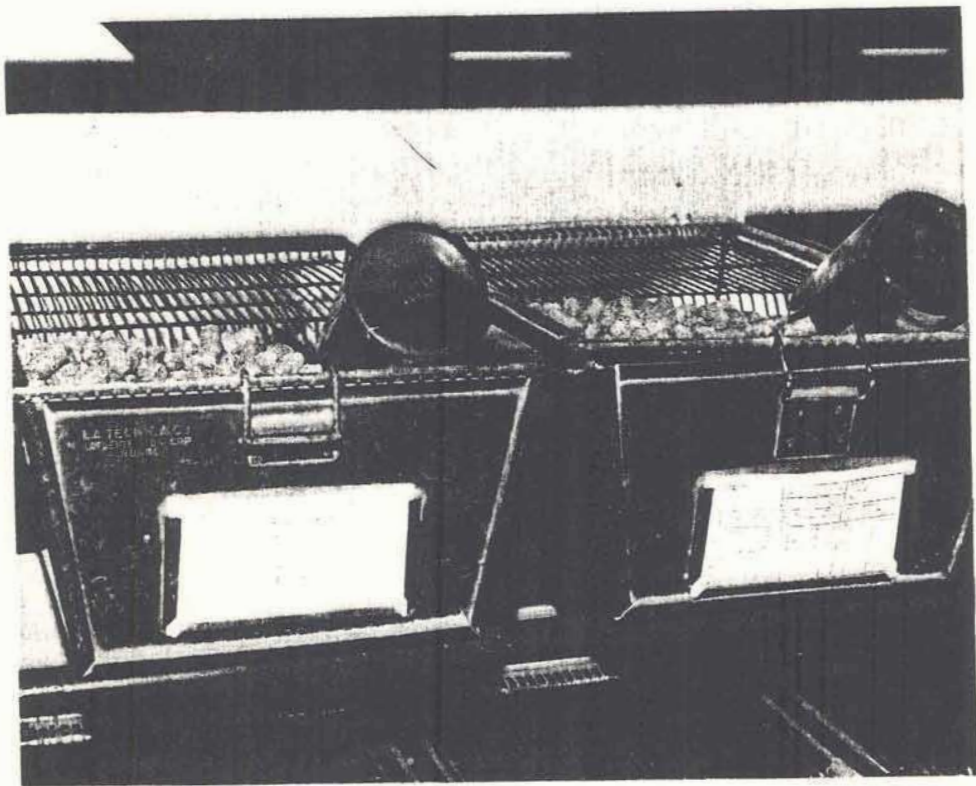
Las condiciones ambientales se mantuvieron controladas. La temperatura osciló entre los 20 y 25 grados centígrados. La humedad relativa ambiente entre el 60% y el 80%. El fotoperíodo se estableció en 12 horas de luz continuadas y 12 horas de oscuridad no superando su intensidad los 20 Fotolux.

Las jaulas que se emplearon para el cautiverio de los animales son de acero inoxidable de 35 cm de largo, 28 cm de ancho (980 cm² de superficie) y 15 cm de altura. El comedero se halla incorporado a la tapa enrejada (figura 2.1.2).

Los animales inmaduros, cuando no se los apareó al destete, fueron colocados en grupos de 3 a 6 individuos por jaula. En ocasiones se utilizaron jaulas más chicas, de 336 cm² de superficie (24 cm de largo, 14 cm de ancho y 12 cm de altura) para alojar individuos jóvenes hermanos de la misma camada.

El lecho colocado en las jaulas consistió en viruta de madera blanca y especialmente en las jaulas de apareamientos se colocó además un trozo de algodón para permitir la construcción del nido.

Figura 2.1.2 CAJAS EMPLEADAS PARA EL MANTENIMIENTO Y CRIA DE LOS ANIMALES.



2.1.3. ALIMENTACION Y SANIDAD DE LOS ANIMALES

Los animales recibieron para su alimentación alimento balanceado simple para ratón, peleteado y compactado por calor.

Si bien ese fue básicamente el alimento principal, en diferentes etapas de la vida de la colonia se aportaron suplementos.

Durante los tres primeros años se suplementó con una masa de alimento preparada en el mismo bioterio con granos de cereales molidos, levadura de cerveza y vitaminas (Vionate-S; Estrella Merieux S.A., Buenos Aires). Dicha masa estaba compuesta por 24% de maíz, 20% de avena, 5% de gluten, 34% de alfalfa, 15% de soja, 2% de levadura y 2 gramos de vitaminas en cada kilogramo de suplemento.

Más adelante (y siempre con el propósito de evitar los posibles perjuicios producidos por las variaciones en la calidad del alimento balanceado de uso comercial) se siguió suplementando la dieta por adición de aceites vegetales y granos de girasol, avena y trigo.

El agua fue acidificada con ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 2,5 para impedir las salmonelosis y la proliferación de algas y bacterias en la botella de suministro. Esta y el alimento fueron suministrados ad-libitum.

Las jaulas fueron totalmente cambiadas y lavadas semanalmente.

Para combatir los endo y ectoparásitos (como por ejemplo

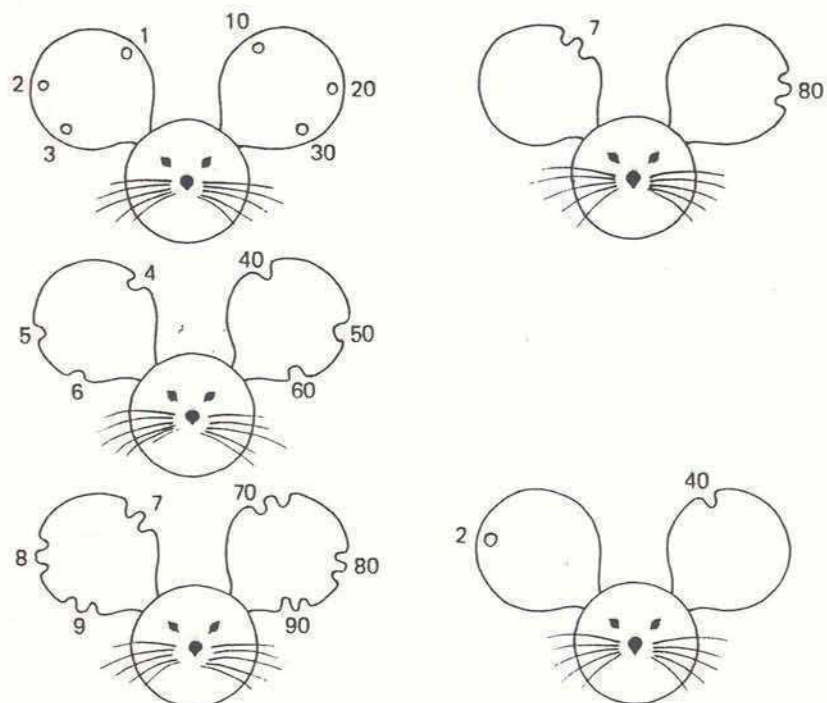
acaros), se utilizó Ivermectina (de Ivomec) la que se diluyó en propilenglicol para adecuar las dosis (según las indicaciones del laboratorio de 200 mg/kg) y se siguieron las instrucciones de una inyección subcutánea seguida de otra a los 15 días.

2.1.4. IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES Y REGISTRO DE LOS DATOS

Los animales adquirieron identidad individual al momento del destete. Fueron marcados en las orejas siguiendo el sistema convencional de marcado para ratón (figura 2.1.4-a.).

En este sistema la oreja se divide en tres zonas: superior media e inferior. Perforando con un pequeño sacabocados agujeros en estas zonas se representan los números 1, 2 y 3 respectivamente. Haciendo con el mismo sacabocados agujeros que lleguen al borde se obtienen muescas simples que en las mismas áreas representan los números 4, 5 y 6. Para el 7 se usa una muesca doble en la parte superior, para el 8 en la zona medial y para el 9 una igual en la parte inferior. En la oreja izquierda se cuentan como decenas mientras que en la oreja derecha se cuentan como unidades esto permite 99 combinaciones.

Figura 2.1.4-a. SISTEMA CONVENCIONAL DE MARCADO (IZQUIERDA).
EJEMPLOS, NUMEROS 87 Y 42 (DERECHA).



Todos los datos identificatorios como: fecha de nacimiento, individualización de los progenitores, sexo, peso al destete y otros datos de cada animal se volcaron en tarjetas individuales (figura 2.1.4-b.) que se mantienen en un fichero.

Para identificar los apareamientos se utilizaron tarjetas convencionales de apareamiento que fueron colocadas en cada jaula (figura 2.1.4-b.). En dichas tarjetas de apareamientos se registró: fecha del apareamiento, edad e identidad de los animales apareados, las pariciones sucesivas que presentó la hembra y el número y sexo de los neonatos así como el momento del destete y el número y sexo de las crías destetadas.

La generación filial se calculó siempre sumando 1 a la menor parental, es decir que un apareamiento formado por un individuo F2 y uno F8 dejó una descendencia a la que se adjudicó la generación F3 (para que metodológicamente se cometiera siempre el mismo error). Se calculó el coeficiente de consanguinidad el que aumentó hasta un valor de 0,4 en la F8 ($F1=0,06$; $F2=0,12$; $F3=0,18$; $F4=0,23$; $F5=0,28$; $F6=0,32$; $F7=0,36$). Al momento de la realización de este trabajo se llegó a la octava generación de cría de laboratorio.

Figura 2.1.4-b. FICHAS UTILIZADAS PARA EL REGISTRO DE DATOS.
FICHA INDIVIDUAL (ARRIBA), FICHA DE APAREAMIENTO (ABAJO).

CNEA		F ₄		Nº 802	
				SEXO ♀	
N: 10-12-88					
P: 387 x 574		(XX)			
Ap: 1-2-89		x ♂ 553 CAJA N° 29			
Nacim:		16-4-89 20 ^º 20 DEST.			
		25-5-89 10 ^º 20 DEST.			
		19-6-89 20 ^º - MUERTOS.			
AP. DADO DE		BAJA 25-6-89..			

CNEA		CEPA		CAJA				
		O						
		O						
O	N.	O	N.	APAREAMIENTO				
←		←						
N.º	NACIMIENTO	N.º	†	DESTETE	O	O	PESO	OBSER.
1								
2								
3								
4								
5								
6								

Formulario N° 195

2.1.5 LOS APAREAMIENTOS

Los apareamientos establecidos siempre fueron monogámicos, formados por un macho y una hembra de edades similares. Los mismos se mantuvieron juntos por un período mínimo de tres meses.

Se formaron también, parejas de animales recién destetados las cuales fueron mantenidas por un período mínimo de 4 meses para establecer el comienzo de la actividad reproductiva.

Si los apareamientos realizados conducían a la preñez de las hembras, las parejas se mantenían hasta el final de su vida reproductiva o hasta la muerte de alguno de sus componentes.

Si en 4 meses de tiempo, las hembras no mostraban signos de preñez entonces se rotaban los machos de las parejas ya formadas para descartar la posibilidad de que la esterilidad fuera inherente al comportamiento de la pareja.

Los controles de cada caja de apareamiento, para corroborar la presencia de hembras gestantes, fijar fechas de nacimiento, observar el estado de salud aparente, agresividad o daño de los animales se realizaron a diario.

2.1.6. PARAMETROS DE CRECIMIENTO

Se estudiaron las variaciones de peso, para lo cual los animales fueron pesados diariamente para determinar la edad del destete según King (1963): edad en la cual se produce una brusca pérdida en la ganancia ponderal que es recuperada en el término de 48 horas.

Por observación directa de los animales se estudiaron algunos parámetros de crecimiento post-natal como el desarrollo del pabellón auricular, el desarrollo de la cobertura pilosa o manto y la apertura de párpados.

Se mantuvieron animales de ambos sexos para determinar la vida máxima y el promedio de vida de esta especie en condiciones de laboratorio. Los datos obtenidos se utilizaron para la construcción de la tabla de vida (Caughley, 1977).

2.1.7. PARAMETROS REPRODUCTIVOS

En los apareamientos monogámicos que se mantuvieron durante un mínimo de 4 meses en las condiciones explicadas en el parágrafo 2.1.5. se calcularon los siguientes parámetros: media de camada a la segunda parición, proporción sexual al nacimiento y al destete, mortalidad pre-destete, eficiencia reproductiva, ocurrencia de celo post-parto, y comienzo y duración de la actividad reproductiva.

El tiempo de gestación fue establecido mediante la observación diaria de las hembras apareadas, considerando la presencia de espermatozoides en los extendidos vaginales como el día 1 de preñez. Se consideró la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal debido a que la observación de tapón mucoso resultó dificultosa.

Se estudió la tasa de ovulación mediante la observación bajo lupa estereoscópica de puntos de ovulación, o puntos hemorrágicos. Se sacrificaron para ello hembras que se hallaban en diferentes estadios de gestación, se contaron puntos de ovulación en ambos ovarios y se observaron embriones implantados vivos o abortivos en ambos cuernos uterinos.

2.1.8 INDUCCION DE LA OVULACION

Se estudió la posibilidad de inducir la respuesta ovulatoria en *A. azarae* mediante la administración de hormonas. La inducción de la ovulación en hembras de mamíferos, con el objeto de producir una superovulación, es un método que se basa en la administración de gonadotrofinas exógenas. Usualmente en los roedores se utilizan gonadotrofinas de yegua (eSG) y de mujer (hCG). La (eSG) tiene un efecto predominantemente foliculo

estimulante (FSH) en cambio la (hCG) tiene efecto predominantemente de LH (hormona luteinizante).

En ratón, Edwards & Gates (1959) obtienen respuestas semejantes al tratamiento con eSG y hCG independientemente del estadio del ciclo estral en que encontraran las hembras. Pero es importante el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración de una y otra hormona. En los roedores pequeños el mecanismo de la ovulación exige un intervalo entre la administración de eSG y hCG necesario para promover el crecimiento, maduración y dehiscencia folicular con liberación de un mayor número de óvulos.

Las hormonas utilizadas para inducir respuesta ovulatoria en **A. azarae** fueron: PMSG (=eSG) gonadotrofina serica equina, para inducir la maduración folicular y HCG (=hCG) gonadotrofina coriónica humana para inducir ruptura folicular (ambas fueron marca Intervert).

Las concentraciones de hormona probadas fueron: 15 ui (unidades internacionales) de PMSG y 20 ui de HCG. Siguiendo los antecedentes previos para el roedor cricétido **Calomys callidus** (Roldán et al., 1985) estas cantidades fueron administradas intraperitonealmente y se ensayaron intervalos de 48 y 72 horas entre la administración de una y otra hormona. Estas se inyectaron dos horas antes de la fase de oscuridad del bioterio.

El siguiente esquema resume el método empleado:

Tiempo (horas)	Tratamiento	
	A	B
0	15 ui PMSG	15 ui PMSG
48	20 ui HCG	-----
62/64	Evaluación*	-----
72	-----	20 ui HCG
84/86	-----	Evaluación*

* La evaluación de la respuesta ovulatoria se realizó mediante la observación bajo lupa estereoscópica. Se recolectaron los ovocitos, se hizo el recuento y caracterización de todos aquellos obtenidos mediante la rotura mecánica de la región ampular del oviducto.

2.1.9. CICLO ESTRAL

Para la obtención del material se utilizaron hembras apareadas monogámicamente que se siguieron diariamente a la misma hora durante 30 días.

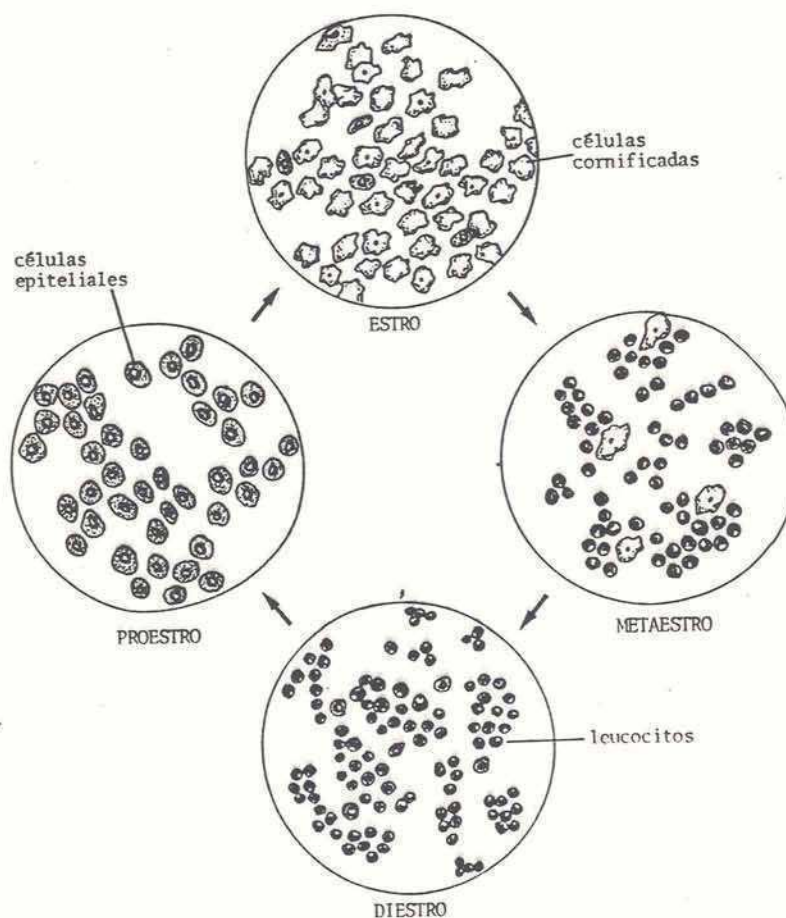
La obtención del material se realizó por lavado de la vagina con un pequeño tip plástico conteniendo una gota de solución fisiológica. Todo el material utilizado fue previamente

esterilizado para evitar contaminar a las hembras y muy suavemente, sin tocar las paredes vaginales para no afectar el normal desarrollo del ciclo. Una gota del material obtenido se extendió sobre un portaobjetos seco y limpio. Se fijó por secado al aire a temperatura ambiente. Luego se hicieron los lavados correspondientes para la coloración con colorante de Shorr.

Los preparados se observaron al microscopio y se estudiaron los tipos de células presentes en el extendido.

Para la clasificación de los tipos celulares se siguió el criterio utilizado en ratón, es decir se consideraron tres tipos celulares: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos. Su presencia y abundancia relativa como indicadores de la etapa del ciclo estral. Este se tomó según el conocido para ratón en estro, meta-estro, diestro y proestro (figura 2.1.8).

Figura 2.1.8—Aspecto del extendido vaginal en el ciclo estral de ratón.



2.1.10. ESTADISTICA

Se utilizaron métodos estadísticos para concluir si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los valores analizados de acuerdo a Sokal & Rohlf (1979).

2.2. RESULTADOS

2.2.1 EVALUACION DE LA PRODUCTIVIDAD DE LA COLONIA

Durante un periodo de 12 meses se evaluó la productividad de la colonia, teniendo en cuenta las variaciones estacionales.

Para realizar dicha evaluación se tuvieron en cuenta la cantidad de apareamientos que fueron efectivos, el total de nacimientos registrados y la frecuencia de canibalismo.

La efectividad reproductiva tomando como índice el número de hembras preñadas/ total de hembras maduras apareadas se consideró estacionalmente (Tabla 2.2.1-a).

El 66% de las hembras resultó preñada en invierno, el 58% en primavera el 40% en verano y el 46% en otoño.

La mayor cantidad de hembras que presentaron partos consecutivos se manifestó en primavera. Esto se vio reflejado en que el mayor porcentaje de nacimientos ha tenido lugar en primavera (34,7%).

Los valores más bajos se registraron en verano, tanto en relación a la proporción de hembras que resultaron preñadas como al porcentaje de nacimientos.

Se analizó la distribución anual de partos considerando las variaciones estacionales. Se observó que el mayor porcentaje de nacimientos tiene lugar en primavera y el menor porcentaje de nacimientos tiene lugar en verano (Tabla 2.2.1-b, Figura 2.2.1).

Uno de los factores que incidieron desfavorablemente en la productividad de la colonia fue el alto porcentaje de canibalismo. Este varió desde un mínimo de 30% hasta un máximo de 66%.

En especies que están recientemente introducidas a condiciones de bioterio, un alto grado de canibalismo es aceptable (Hodara et al., 1984). Pero probablemente estos resultados reflejan el poco conocimiento de la biología de esta especie lo cual resulta en que las condiciones de bioterio no son las ideales para *A. azarae*.

Por ejemplo al estar forzando un sistema de apareamiento monogámico permanente en una especie que en la naturaleza muestra una táctica reproductiva no monogámica (Zuleta et al., 1988), dietas insuficientes o desbalanceadas así como factores de perturbación ambientales comunes como el nivel de ruidos. Todos estos factores pueden reflejarse en un alto porcentaje de canibalismo.

TABLA 2.2.1-a Evaluación de la incidencia de preñez en la colonia.

Estación	otoño	invierno	primavera	verano
Hembras maduras en la colonia (T)	50	44	53	47
Tuvieron cría al menos una vez	23 (46)	29 (66)	31 (58)	19 (40)
Hembras con 2 partos consecutivos	7 (31)	9 (31)	12 (39)	8 (42)
3 ó más	1 (4)	6 (21)	8 (26)	0 (0)

* los valores entre paréntesis son porcentajes.

TABLA 2.2.1-b Evaluación de la productividad de la colonia.

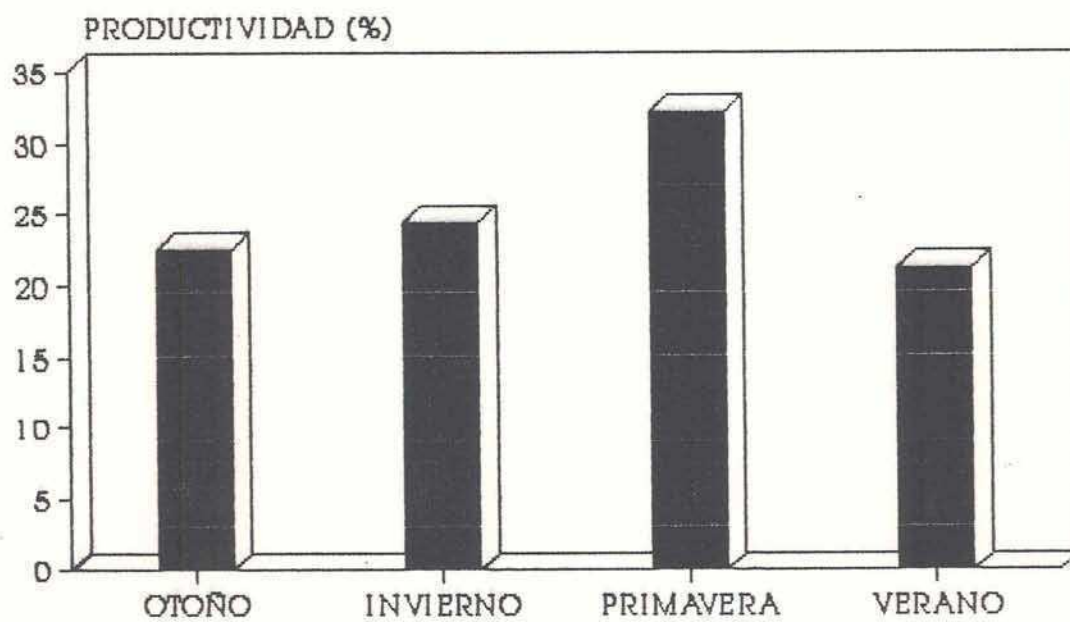
Estación	otoño	invierno	primavera	verano
Número de nacimientos registrados	33	51	59	27
% estacional	19,4	30,0	34,7	15,9
** corrección	22,5	24,3	32,0	21,2

NOTA

** Los valores corregidos para los porcentajes de nacimientos estacionales se obtuvieron considerando como 100% las hembras que parieron. Lo que permite evitar el error producido al sumar al porcentaje de nacimientos el porcentaje de hembras que no parieron.

Ejemplo: en otoño hubo 33 nacimientos que correspondieron a un 46% de hembras que parieron, si éstas hubieran sido el 100% habría habido 72 nacimientos. Estos 72 nacimientos representarían un 22,5% de los 318 nacimientos que hubieran ocurrido en dichas condiciones.

Figura 2.2.1 EVALUACION DE LA PRODUCTIVIDAD



2.2.2 TASA DE OVULACION NORMAL

Se estudió la tasa de ovulación, según se describe en el parágrafo 2.1.7. La media de puntos de ovulación observados fue de $\bar{X} = 6,87$ D.S. = 0,8 (n=15).

Se observó un bajo rango de variación individual, el mínimo de cuerpos lúteos observados fue de 6 y el máximo 8.

La edad de las hembras analizadas varió entre 8 meses y 17 meses. Para estudiar la posibilidad de que la tasa de ovulación pudiera variar con la edad, se analizaron por separado las hembras de menos de 12 meses de edad y las de más de 12 meses de edad.

Se se realizó un test de T y pudo determinarse con un 95 % de confianza que el número promedio de cuerpos lúteos observados no varía con la edad de las hembras (Tabla 2.2.2).

Tabla 2.2.2. Número promedio de cuerpos lúteos observados.

Edad	(n)	Media de puntos de ovulación	
< de 12 m	(7)	$\bar{X} = 7,14$	D.S. = 0,9
> de 12 m	(8)	$\bar{X} = 6,63$	D.S. = 0,7

La tasa de ovulación se estudió también en relación al cariotipo de las hembras, este análisis se presenta en el parágrafo 3.2.9.

2.2.3 INDUCCION DE LA RESPUESTA OVULATORIA

Se determinó que la respuesta ovulatoria en *A. azarae* puede inducirse mediante la administración de 15 ui de PMSG y 20 ui de HCG. Estas hormonas deben administrarse separadas por un intervalo de 72 horas. Un intervalo de 48 horas no es suficiente, con dichas cantidades hormonales para obtener respuesta ovulatoria.

Tabla 2.2.3 Inducción de la ovulación

	N de hembras tratadas	N de hembras con respuesta ovulatoria

Tratamiento A		

Intervalo entre PMSG y HCG de 48 horas.	10	0

Tratamiento B		

Intervalo entre PMSG y HCG de 72 horas.	11	7 (64%)

Mediante el tratamiento B (ver párrafo 2.1.8) fue posible obtener un 64% de hembras que respondieron a la administración de hormonas exógenas. Debido a que la ovulación normal máxima en esta especie es de 8 (párrafo 2.2.2) se consideró respuesta superovulatoria cuando el número de ovocitos recolectados fue igual o superior a 9. Cuando el número de ovocitos recojidos fue menor o igual a 8 se consideró respuesta ovulatoria normal:

Tratamiento B

Hembras con respuesta ovulatoria	Normal	Superovulatoria
7 (64%)	2 (18%)	5 (46%)

Las hembras que superovularon presentaron una variación individual de 14 a 22 ovocitos.

Un estudio acabado de la respuesta ovulatoria en esta especie podría hacerse incluyendo el análisis del efecto de otras hormonas como la PLH (hormona luteinizante pituitaria), que en lugar de la HCG en hembras maduras de hamster chino permite una mejor superovulación (Roldán et al., 1987).

2.2.4 TAMAÑO DE CAMADA

Se registró la media de camada, medida en la segunda parición. Esta fue $\bar{X} = 3,6$ ($n = 20$) el rango fue de 1-8 crías por camada y la desviación estandard de 1,8.

Un análisis más detallado de la media de camada se presenta en el parágrafo 3.2.1.

2.2.5 PROPORCION DE SEXOS Y MORTALIDAD PRE-DESTETE

Se analizaron para obtener tanto la proporción de sexos como la mortalidad pre-destete, 294 camadas nacidas a partir de 79 hembras apareadas.

La proporción de sexos al nacimiento fue de 1,62 hembras por macho ($n = 1045$), mientras que al destete fue de 1,48 hembras por macho ($n = 712$). Debido a que la proporción de sexos se halla desviada en relación al 1:1 dependiendo del cariotipo de las hembras progenitoras, estos resultados globales se han desglosado para estudiar la proporción de sexos según el cariotipo de las madres (parágrafo 3.2.2).

La mortalidad pre-destete total fue de 31,9 % siendo para las hembras mayor que para los machos, 34,3 % y 28,1 % respectivamente.

La mortalidad pre-destete estacional fue siempre mayor para las hembras que para los machos excepto en primavera que fue levemente mayor para los machos.

2.2.6 DURACION DE LA GESTACION Y OBSERVACIONES SOBRE CICLO ESTRAL.

La duración de la gestación fue de 23 días con un rango de 21 a 25 días. Se evaluó a partir de 73 partos de 35 hembras multiparas las que tenían edades de entre 6 y 18 meses.

El promedio obtenido fue de $X = 22,98$ (D.S = 1,2) (N = 73).

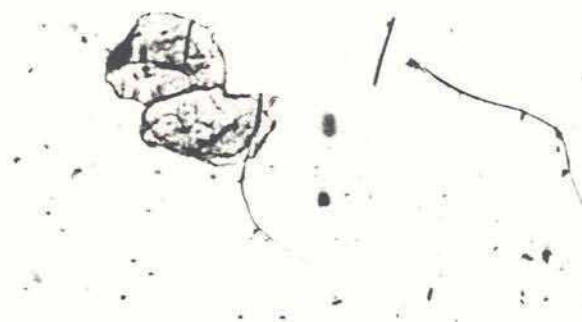
Como no fue posible observar un tapón vaginal evidente, como si ocurre en las hembras de ratón después de la cópula, por ese motivo se tomó como día 1 de preñez el día en que se hallaron espermatozoides en el extendido vaginal (figura 2.2.6).

La mayoría de las veces que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal, fue posible ver una descarga vaginal mucosa pero no un claro tapón.

El ciclo estral de *A. azarae* no ha sido evidenciable en forma precisa, mostrando las hembras una irregularidad considerable en la presentación de patrones celulares claros que permitieran distinguir estadios con total certeza.

El diagnóstico de las fases del ciclo estral ha resultado extremadamente dificultoso mediante la metodología descrita en el parágrafo 2.1.8. Esta técnica es útil para corroborar la existencia de celos post-parto y apareamientos realizados en este periodo (figura 2.2.6).

FIGURA 2.2.6 ASPECTO DEL EXTENDIDO VAGINAL POCAS HORAS DESPUES DE LA COPULA.



2.2.7 PRESENCIA DE CELO-POST PARTO Y RETRASO EN LA IMPLANTACION

Con el objeto de estudiar si existe un retraso en la implantación se analizaron 89 partos que tuvieron lugar en el celo post-parto de 30 hembras analizadas.

Se intentó correlacionar el tiempo que duró la gestación con el número de crías paridas en el parto anterior que la hembra se hallaba amamantando (tabla 2.2.7, figura 2.2.7).

La mayoría de los partos tuvieron lugar a los 24 días del parto anterior y no se observó una relación entre el número de crías amamantadas y el tiempo transcurrido entre un parto y el otro.

El 13,5 % de los partos ocurridos por estro post-parto sufrieron un retraso en la implantación de hasta 5 días.

Considerando que el periodo de gestación es de 23 días (parágrafo 2.2.4) consideramos que el estro postparto tiene lugar entre las 24 y 72 horas posteriores al parto.

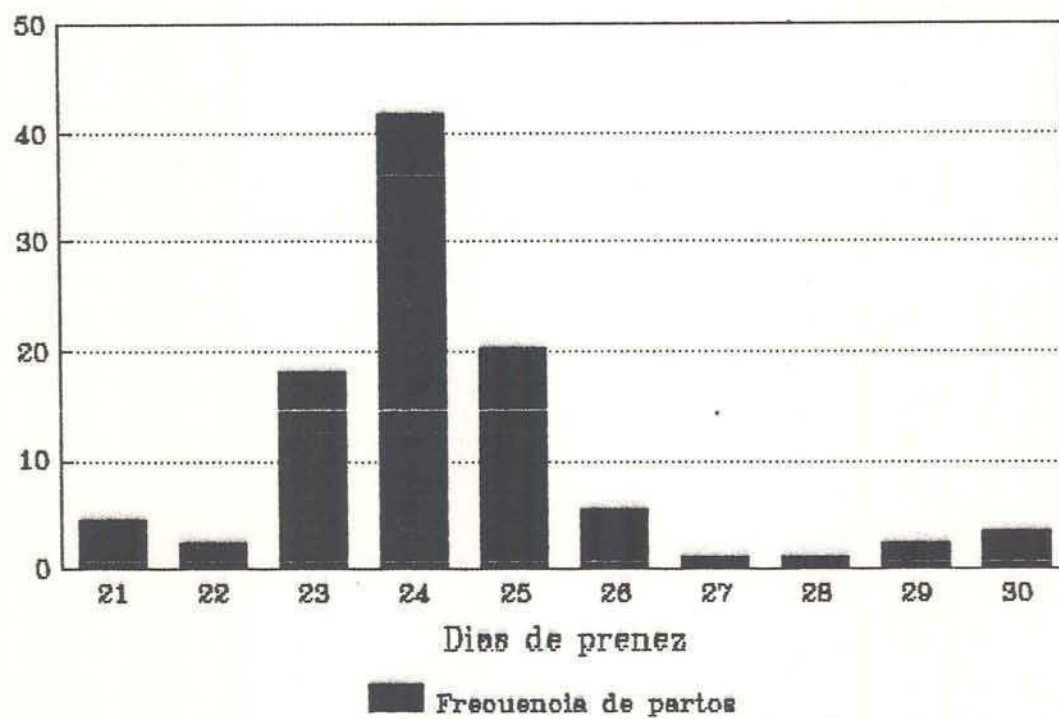
TABLA 2.2.7

CELO POST PARTO Y RETRASO EN LA IMPLANTACION

Días de preñez	No de partos	No promedio de crías*
21	4 (4,5%)	2
22	2 (2,3%)	3
23	16 (18,0%)	2
24	37 (41,6%)	2,5
25	18 (20,2%)	2,9
26	5 (5,6%)	2
27	1 (1,1%)	1
28	1 (1,1%)	1
29	2 (2,3%)	1,5
30	3 (3,4%)	1,7

*No promedio de crías que la hembra amamantaba .

FIGURA 2.2.7 ESTRO POST-PARTO



2.2.8 PARAMETROS DE CRECIMIENTO POST NATAL Y EDAD DEL DESTETE

La cobertura pilosa se completó entre los 8 y los 9 días de edad, la media fue $X = 8,5$ días. La apertura de párpados también tuvo lugar entre los 8 y los 9 días de edad, la media fue $X = 8,7$ días.

El pabellón auricular ya al nacimiento se encuentra separado y bien formado (Tabla 2.2.8).

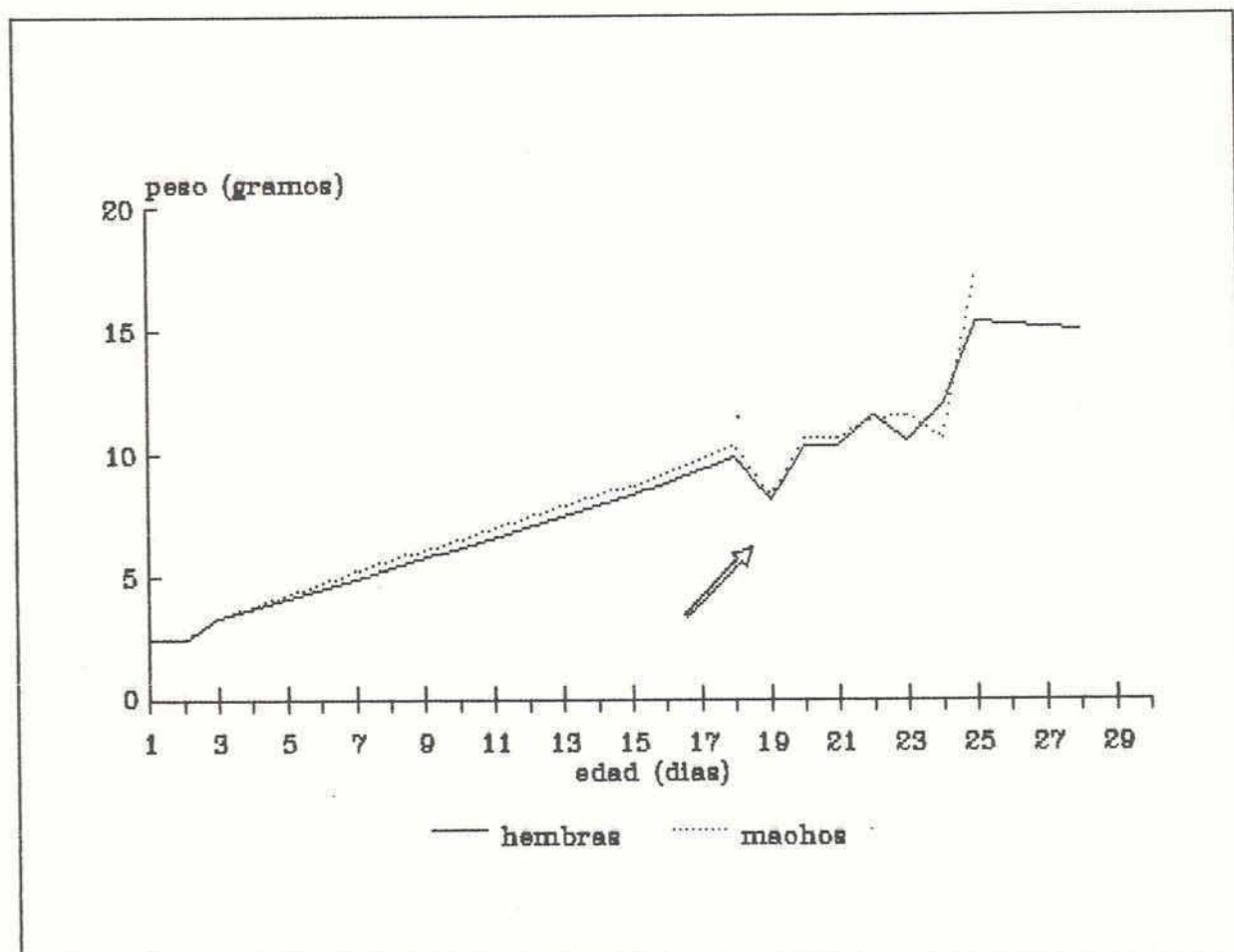
TABLA 2.2.8 Desarrollo post-natal de Akodon azarae

	N	Media (días)	Rango (días)
Separación del pabellón auricular	35	Desde el nacimiento	-----
Manto completo	23	8,5	8 - 9
Apertura de párpados	15	8,7	8 - 9

El período de destete natural según la curva de crecimiento (figura 2.2.8) correspondió a los 19 días de edad tanto para los machos como para las hembras; tomando éste como el descenso en los valores de peso que se recuperan en 48 horas (King, 1963).

Los machos se presentaron ligeramente más pesados que las hembras, presentaron un incremento de peso diario (0,48 gramos / día) levemente superior al de las hembras (0,45 gramos / día), este incremento se observó hasta la edad del destete.

FIGURA 2.2.8: EDAD DEL DESTETE



2.2.9 INICIO Y DURACION DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA

Para establecer el inicio de la actividad reproductiva de los machos se utilizaron 17 machos apareados con hembras de la misma edad (apareados al destete). Usualmente la madurez sexual en los machos ocurrió a las 10 semanas de edad. La edad del macho al primer nacimiento fue de $X=95$ días, $D.S.=12$ ($N=17$).

Considerando un período de gestación de la hembra de alrededor de 23 días, los machos fueron capaces de preñar a las hembras cuando tenían alrededor de 10 semanas de edad.

La menor edad registrada para un macho fue de 54 días (un macho que al primer nacimiento tenía 75 días de edad por lo cual a los 53 días ya fue fértil. La menor edad al primer parto registrada en una hembra fue de 60 días.

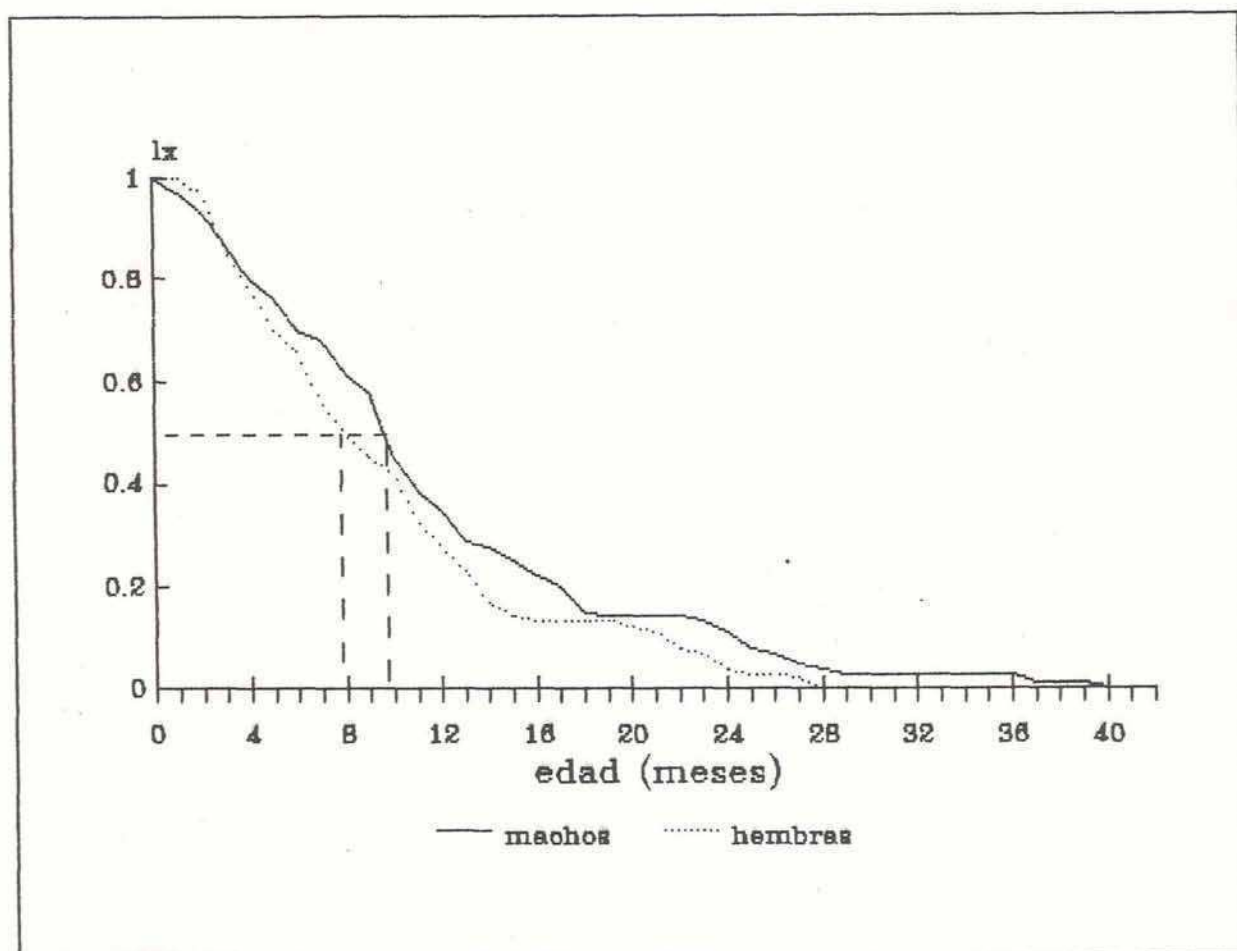
El inicio de la actividad reproductiva en las hembras se estudió en relación al cariotipo de las mismas (parágrafo 3.2.4).

2.2.10. LONGEVIDAD DE *A. azarae* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

La tabla de vida para machos y para hembras ha sido construida a partir de 71 machos y 101 hembras que se mantuvieron hasta su muerte natural. Consiste en cuatro columnas: Edad: a intervalos de dos meses; fx : el número de sobrevivientes a los dos cuatro y más meses después del nacimiento de los 71 machos y las 101 hembras originales; lx : la supervivencia (la probabilidad al nacimiento de sobrevivir hasta la edad x) y finalmente dx : la frecuencia de mortalidad - la probabilidad de muerte durante un intervalo de edad ($x ; x + 1$).

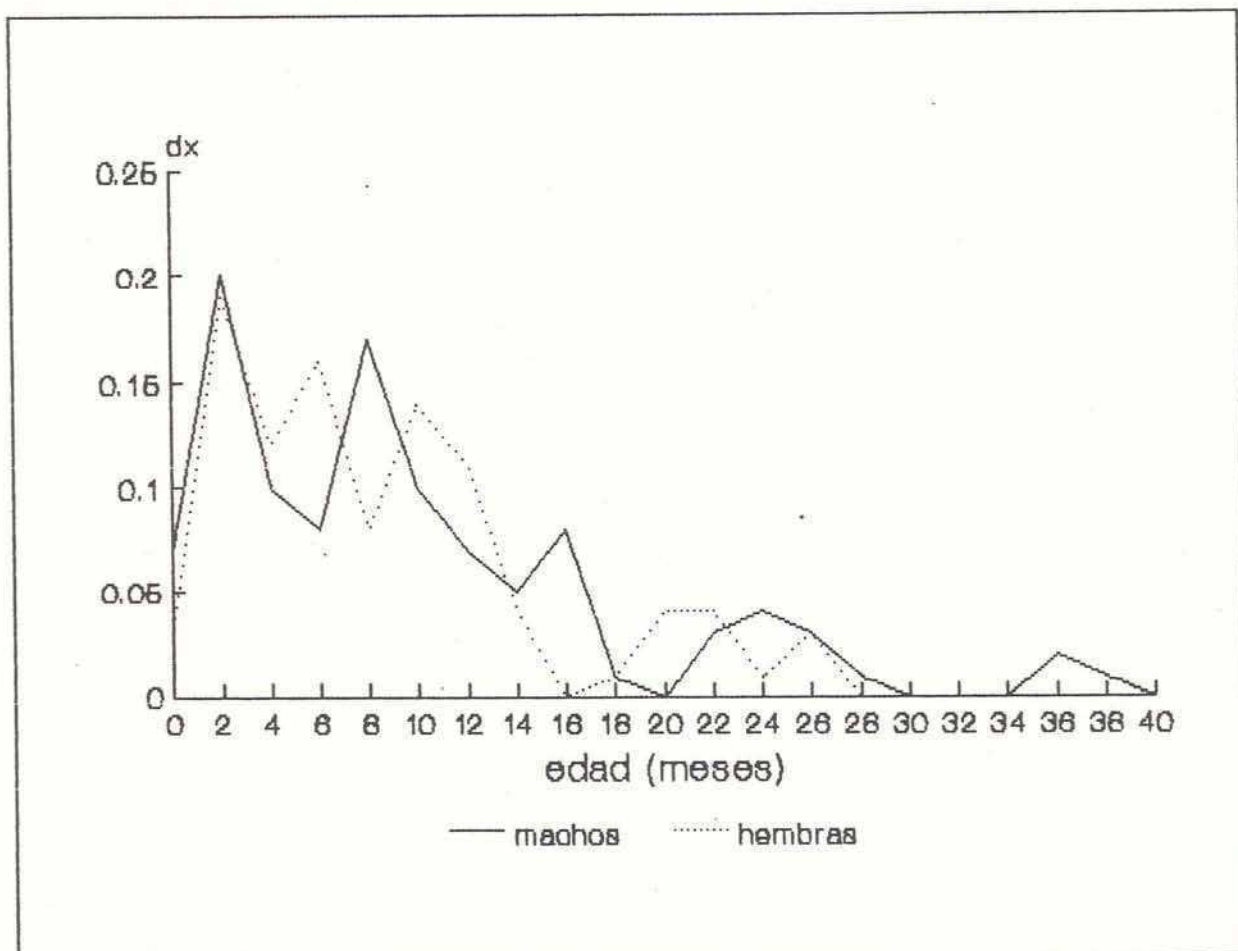
Los gráficos 2.2.10-a y 2.2.10-b ilustran la supervivencia (lx) y la mortalidad (dx) respectivamente.

FIGURA 2.2.10-a CURVA DE SOBREVIVENCIA



En el eje vertical se ilustra la probabilidad (lx) que tienen los animales de sobrevivir hasta la edad que se grafica en el eje horizontal. El 50% de las hembras no supera los 8 meses de edad así como el 50% de los machos no supera los 10 meses de edad.

FIGURA 2.2.10-b FRECUENCIA DE MORTALIDAD



Las edades en que la probabilidad de muerte fue mayor, resultaron para los machos, los 2 meses, los 8 meses y los 16 meses. Para las hembras se repitió un mismo patrón de tres picos pero a los 2, 6 y 10 meses

Tabla de vida para los machos

Edad	f_x	l_x	dx
0	71	1,00	0,07
2	66	0,93	0,20
4	57	0,80	0,10
6	50	0,70	0,08
8	44	0,62	0,17
10	32	0,45	0,10
12	25	0,35	0,07
14	20	0,28	0,05
16	16	0,23	0,08
18	11	0,15	0,01
20	10	0,14	0,00
22	10	0,14	0,03
24	8	0,11	0,04
26	5	0,07	0,03
28	3	0,04	0,01
30	2	0,03	0,00
32	2	0,03	0,00
34	2	0,03	0,00
36	2	0,03	0,00
38	1	0,01	0,01
40	0	--	--

Tabla de vida para las hembras

Edad	f_x	l_x	dx
0	101	1.00	0,03
2	98	0,97	0,19
4	79	0,78	0,12
6	67	0,66	0,16
8	51	0,50	0,08
10	42	0,42	0,14
12	28	0,28	0,11
14	17	0,17	0,04
16	13	0,13	0,00
18	13	0,13	0,01
20	12	0,12	0,04
22	8	0,08	0,04
24	4	0,04	0,01
26	3	0,03	0,03
28	0	--	--
30			

En nuestra colonia una alta proporción de animales vivió más allá de la edad calculada bajo condiciones naturales (Zuleta, 1989) y aún presentaron actividad reproductiva (Tabla 2.2.10). Un 15,5 % de los machos vivió más de 18 meses y un 18,8 % de las hembras vivió más de 13 meses.

La mayor edad alcanzada por un macho fue de 40 meses y el promedio de vida para los machos fue calculado en 11,4 meses (347 días). La mayor edad alcanzada por una hembra fue de 28 meses y el promedio de vida fue de 9,6 meses (292 días).

Tabla 2.2.10 Número de animales que vivieron.

sexo	(n)	< 12 m.	12-24 m.	> 24 m.
machos	(71)	46 (64,8%)	17 (23,9%)	8 (11,3%)
hembras	(101)	73 (72,3%)	23 (22,8%)	5 (4,9%)

TABLA RESUMEN

Parámetros reproductivos de *Akodon azarae*.

Tamaño medio de camada
(segunda camada) (20)*.....3,6 \pm 1,8 (rango: 1-8)

Proporción de sexos
(hembras/machos) (294)*

-Al nacimiento.....1,62

-Al destete.....1,48

Mortalidad pre-destete (294)*

-General.....31,9 %

-Machos.....28,1 %

-Hembras.....34,3 %

Edad del destete.....19 días.

Inicio de la actividad reproductiva **

-Machos.....54 días

-Hembras.....60 días

Tasa de ovulación..... 6 a 8 cpos. lúteos

Periodo de gestación.....22,98 \pm 1,16 (rango: 21-25)

Celo post-parto.....de 24 a 72 horas posteriores.

Retraso en la implantación.....de hasta 5 días (en el 13 %)

* Valores entre paréntesis: número de camadas examinadas

** La menor edad registrada.

2.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES

Pocos han sido los estudios realizados sobre la biología de los cricétidos en general y en particular su desempeño en colonias. Debido a la escasa información, la cría y manejo de *A. azarae* se basó en la experiencia de investigadores que trabajaron con otras especies y se fueron resolviendo dificultades de manejo durante el desarrollo del trabajo. Se han estudiado los parámetros básicos más comunes, necesarios para utilizar los animales de esta especie como modelo experimental.

La productividad de la colonia, que varió desde un mínimo del 21,2% hasta un máximo del 32% es baja si se la compara con la de animales que llevan muchas generaciones de cría en laboratorio, pero está dentro del rango de productividad que se ha obtenido para otros cricétidos (De Villafañe, 1981; Hodara et al., 1984 y 1989; Mello & Mathias, 1987). Se ha observado una disminución (después de varios años de cría en laboratorio) de la agresividad, si bien ha aumentado la docilidad para el manejo las peleas entre adultos y el descuido de las crías resultan aún inconvenientes.

Bajo condiciones ambientales controladas, *a. azarae* muestra aún una leve tendencia estacional con un mayor porcentaje de nacimientos en primavera pero las diferencias estacionales no son tan marcadas como las observadas en el campo (Crespo et al., 1970; Zuleta et al., 1988) y aún *A. azarae* mostró actividad reproductiva durante el periodo invernal (lo que no ocurre en la

naturaleza).

La tasa de ovulación normal siempre resultó mayor a la media de camada, evidenciando una elevada pérdida embrionaria (alrededor del 50%). En pequeños roedores en cautividad las camadas tienden a ser más pequeñas que en el campo, este fenómeno que se ha observado en varias especies de microtininos europeos (Kalela, 1961; Kalela & Oksala, 1966) se presenta también en **A. azarae**. La media de camada obtenida en nuestra colonia es similar a la obtenida en otras especies de **Akodon** (Mello & Mathias, 1987; Roldán et al., 1984) y la misma que la obtenida por De Villafañe (1981) para **A. azarae**. Sin embargo ésta podría elevarse sustancialmente, teniendo en cuenta la tasa de ovulación, si se deseara seleccionar animales en esta dirección.

Para obtener tasas de ovulación superiores a las normales se recurre a la inyección de gonadotrofinas en determinados momentos del ciclo estral que son visibles exteriormente, por ejemplo en hamster adultos (Yanagimachi & Chang, 1964; Yanagimachi, 1969). Sin embargo es posible en algunas especies inducir estro y ovulación (o superovulación) mediante la administración de gonadotrofinas en cualquier momento del ciclo estral de la hembra, por ejemplo en ratón (Rafferty, 1970; Fowler & Edwards, 1957).

En roedores como **Mus**, **Rattus**, y **Mesocricetus** el intervalo tanto como la dosis de hormonas son los factores de los que depende el número de óvulos obtenidos (Wilson & Zarrow, 1962;

Neal & Baker, 1973). Particularmente en ratón la relación frente al estímulo depende también de la cepa con que se trabaja (Fowler & Edwards, 1957) y existe también una influencia ambiental como estacional (Rafferty, 1970).

La respuesta ovulatoria obtenida en **A. azarae** es satisfactoria, 64% frente a una respuesta de entre el 50 y el 70% que se obtiene el ratón (en condiciones consideradas ideales). Y es posible obtenerla en cualquier momento del ciclo en que se hallen las hembras

En **A. azarae** nos aproximamos con las dosis e intervalos de tiempo probados, sin embargo este antecedente permitirá investigar los efectos tanto ambientales como estacionales así como mejorar el rendimiento ensayando otros tiempos de recolección de ovocitos.

Para determinar la duración o el estadio del ciclo en que se hallan las hembras en ratón, hamster o rata se utiliza como criterio el tipo de células que se observa por descamación vaginal, ya que presentan una clara correspondencia entre el estado hormonal y el tipo de epitelio vaginal. En cambio en **A. azarae** no es posible correlacionar el tipo de células que se obtienen por extendidos vaginales con el estado hormonal de las hembras. Esto también ha sido observado en dos especies de **Dipodomys** (Wilson et al., 1985) en **Peromyscus californicus** (Gubernick, 1988) y en **Calomys musculinus** (Montoro et al., 1987). La falta de secuencia y periodicidad en el patrón de los cuadros colpocitológicos en **A. azarae**, como en otras especies de roedores

silvestres (op. cit.), impide que sea utilizada esta metodología para la determinación de la duración y caracterización del ciclo estral. Para ello será necesario emplear un riguroso estudio hormonal, la utilidad que presentan los cuadros colpocitológicos reside en la determinación de estros francos y apareamientos realizados durante el estro.

La proporción de sexos, que se observó desviada en relación al 1:1 esperado, se discutirá en referencia al cariotipo de las hembras progenitoras debido a que la proporción sexual depende del tipo de cromosomas sexuales que portan las madres.

La mortalidad pre-destete fue alta cuando se la compara con especies bien adaptadas a bioterio (Festing, 1976) pero tal como se discutió para la productividad, se halló dentro del rango presentado por otros cricétidos aunque en *A. azarae* se observó una mayor mortalidad pre-destete para las hembras. En general la mortalidad pre-destete es levemente mayor para los machos de acuerdo a la regla de Haldane que establece la labilidad del sexo heterocigota (Parkes, 1976) lo que ocurre en *A. azarae* no refleja este principio.

La duración de la gestación, de 23 días, así como la presencia de celo post-parto en *A. azarae* no son fenómenos diferentes a lo que ocurre por ejemplo en *A. arviculoides* (Mello & Mathias, 1987) o *A. molinae* (Merani & Lizarralde, 1980). El celo post-parto existe también en otros cricétidos como *Calomys musculus* (De Villafañe, 1981) *C. callosus* (Justines & Johnson,

1970) y **C. laucha** (Hodara et al., 1989) probablemente este fenómeno sea común a todos los pequeños roedores.

Los parámetros de crecimiento post-natal no difieren de los de otros cricétidos estudiados en condiciones de laboratorio (Richmond & Konoway, 1969; Lee & Horvath, 1969; Kruckenberg et al., 1973; Moore, 1965; Justines & Johnson, 1970; Mello, 1978). Es destacable la observación de la edad del destete (19 días) ya que en general se procede a destetar los animales a los 21 días de edad tal como en ratón cuando se inician colonias de estos cricétidos, lo cual posiblemente afecte desfavorablemente el parto siguiente si la hembra se ha preñado en el estro post-parto.

La cobertura pilosa así como la apertura de párpados ocurren entre los 8 y 9 días de edad y así como en otros cricétidos, el pabellón auricular externo ya se observa abierto al nacimiento, (Merani & Lizarralde, 1980; Hodara et al., 1984; Hodara et al. 1989) lo que no ocurre en otros roedores de laboratorio (Rugh, 1968; Marston, 1976).

Bajo condiciones naturales, la longevidad máxima para **A. azarae** ha sido calculada en 18 meses para los machos y 13 meses para las hembras. La vida media bajo dichas condiciones fue de 5-6 meses (Zuleta, 1989).

El patrón de mortalidad fue similar para machos y hembras, presentando tres picos. El primero, que refleja la mortalidad juvenil coincidió tanto para machos como para hembras a los dos meses de edad. Los otros dos picos, que reflejan la mortalidad de

adultos se presentaron a menor edad en las hembras que en los machos (a los 6 y 10 meses en las hembras y a los 8 y 16 meses en los machos). La longevidad máxima es mayor que la registrada en condiciones naturales pero es coincidente en que los machos son más longevos que las hembras.

A. azarae como otras especies de roedores cricétidos comparten ciertas características que la hacen apta para la cría en laboratorio (como el corto período de gestación y la presencia de celo post-parto), aunque es necesario mantenerlos durante muchas generaciones ya que la agresividad natural de esta especie puede ser un inconveniente.

CAPITULO 3

3 BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE HEMBRAS XX Y Xx

3.1 MATERIALES Y METODOS

El desempeño de la función reproductiva de las hembras homogaméticas y heterogaméticas *Akodon azarae* se estudió en animales de la colonia que se originó y mantuvo como se describe en el parágrafo 2.1. Las hembras de cada uno de los dos genotipos, XX y Xx se distinguieron mediante preparaciones cromosómicas realizadas al nacimiento de los animales mediante el cultivo de biopsias de tejido hepático (parágrafo 4.1.1.1). Posteriormente el cariotipo fue corroborado por el análisis de preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de médula ósea (parágrafo 4.1.1.2.).

Para evaluar los parámetros reproductivos se utilizaron apareamientos monogámicos de 35 hembras homogaméticas (XX) y de 43 hembras heterogaméticas (Xx). Estos apareamientos fueron mantenidos en idénticas condiciones de laboratorio y las generaciones filiales de las hembras consideradas fueron de F3 a F5.

Los parámetros que se estudiaron para analizar la capacidad reproductiva, en forma comparada, de ambos tipos de hembras fueron los siguientes.

El número de camadas producidas por una hembra durante el periodo considerado. La edad de la hembra al primer y al último parto.

El tamaño de la camada al nacimiento y al destete, la mortalidad pre-destete. La proporción de sexos al nacimiento y al destete. La longitud de la vida reproductiva. El intervalo entre partos consecutivos.

La fecundidad en relación a la edad de la hembra. La tasa de ovulación y la pérdida embrionaria pre-natal.

Para establecer si las diferencias observadas son estadísticamente significativas se utilizaron test estadísticos tal como se describen en Sokal & Rohlf (1979).

3.2. RESULTADOS

3.2.1. MEDIA DE CAMADA

Se evaluó la media de camada de 15 hembras XX y 22 hembras Xx, en el segundo parto. Para las hembras XX la media de camada fue de 3,4 (D.S.=1,5) con un rango de 1-6 y para las hembras Xx ésta resultó de 4,0 (D.S.=1,6) y el rango de 2-8 (Tabla 3.2.1-a).

Se utilizó un test de T de Student para saber si las diferencias observadas son estadísticamente significativas.

Tabla 3.2.1-a. Media de camada en el segundo parto

Tipo de hembra	Media de camada (2o parto)	Rango	N
XX	3,4 (D.S. 1,5)	1 - 6	15
Xx	4,0 (D.S. 1,6)	2 - 8	22

La media de camada en el segundo parto resultó ser levemente mayor para las hembras Xx que para las hembras XX.

Sin embargo las diferencias entre las medias de camada no son estadísticamente significativas.

Si en lugar de tomar solamente el segundo parto se tienen en cuenta todas las pariciones sucesivas de dichas hembras, la media

de camada observada resulta ser de 3,8 crías, (D.S. 1,5) con un rango de 1 a 6 crías para las hembras XX y de 3,6 (D.S. 1,7) con un rango de 1 a 8 crías por camada para las hembras Xx (Tabla 3.2.1-b).

Tabla 3.2.1-b. Media de camada en todas las pariciones

Tipo de hembra	Media de camada	Rango	N
XX	3,8 (D.S. 1,5)	1 - 6	61
Xx	3,6 (D.S. 1,7)	1 - 8	87

Las diferencias observadas no resultaron ser estadísticamente significativas.

El tamaño medio de camada, ya sea analizando solamente el segundo parto o todos los partos consecutivos, ha resultado ser de entre 3 y 4 crías por camada. No es posible afirmar que existan diferencias estadísticamente significativas entre el número de crías producidas por camada entre las hembras XX y las hembras Xx.

3.2.2. PROPORCION DE SEXOS

Para analizar la proporción de sexos se consideró la progeñe de 18 hembras XX y 27 hembras Xx.

De 49 camadas producidas por las hembras XX se registraron 97 machos nacidos y 87 hembras. De ellos se destetaron 58 machos y 51 hembras.

La proporción sexual al nacimiento fue de 0,89 hembras/macho y al destete fue de 0,88 hembras/macho.

De 131 camadas producidas por las hembras Xx se registraron 142 machos nacidos y 322 hembras. De ellos se destetaron 101 machos y 220 hembras.

La proporción de sexos al nacimiento fue de 2,27 hembras/macho y al destete fue de 2,18 hembras/macho.

La mayoría de los mamíferos tiene una proporción sexual al nacimiento muy cercana a 1:1 y generalmente se presenta una leve preponderancia de machos que es ignorada. Si se sospecha una marcada disparidad de sexos, la proporción sexual observada puede ser testeada por Chi² (Caughley, 1977).

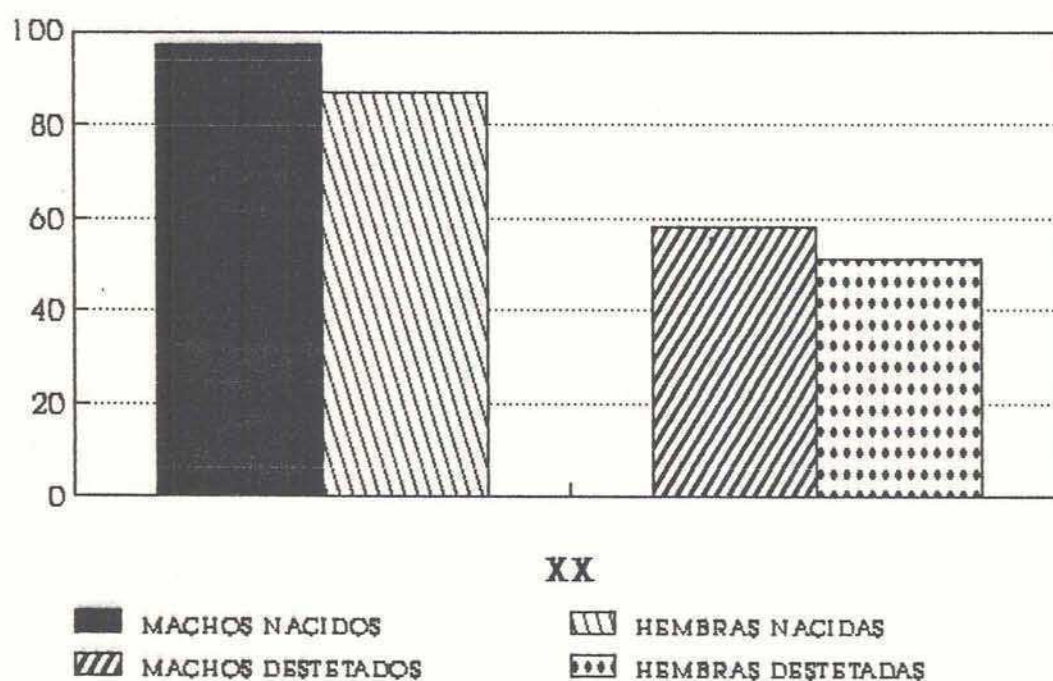
La Tabla 3.2.2 muestra el test en las crías de hembras XX y Xx.

La proporción de sexos en la muestra de progenitoras XX no es significativamente diferente de la esperada 1:1. La probabilidad Chi² de la muestra de crías provenientes de hembras Xx es lo suficientemente baja, lo que indica que la disparidad observada en favor de las hembras es real y no debida a un error de muestreo.

TABLA 3.2.2 Análisis de la proporción de sexos.

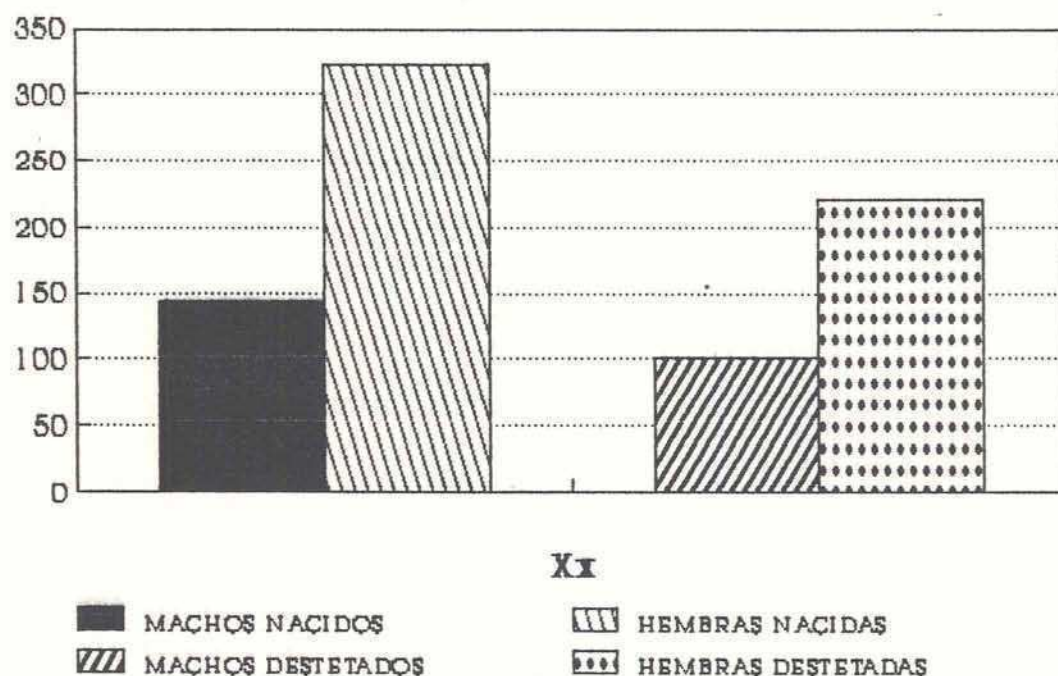
		O	E	O-E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	P
Tipo de hembras XX	Machos	97	92	5	0,27	0,5 gl.:1
	Hembras	87	92	-5	0,27	
	Total	184			$\chi^2 = 0,54$	
		O	E	O-E	$\frac{(O-E)^2}{E}$	P
Tipo de hembras Xx	Machos	142	232	-90	34,9	<0,0005 gl.:1
	Hembras	322	232	90	34,9	
	Total	464			$\chi^2 = 69,8$	

**FIGURA 3.2.2-a. PROPORCION DE SEXOS EN LA PROGENIE DE HEMBRAS XX
AL NACIMIENTO Y AL DESTETE**



En el gráfico se ilustran los 97 machos y 87 hembras nacidos (izquierda) frente a los 58 machos y 51 hembras destetados (derecha), correspondientes a 49 camadas producidas por hembras XX.

**FIGURA 3.2.2-b. PROPORCION DE SEXOS EN LA PROGENIE DE HEMBRAS Xx
AL NACIMIENTO Y AL DESTETE**



En el gráfico se ilustran los 142 machos y 322 hembras nacidos (izquierda) frente a los 101 machos y 220 hembras destetados (derecha) correspondientes a 131 camadas producidas por hembras Xx.

La proporción de sexos se analizó para cada camada, tanto en la progenie de las hembras XX como en la progenie de las Xx.

Para cada camada se calculó el número de hembras sobre el total de crías nacidas:

$$* \frac{N \text{ hembras}}{N \text{ hembras} + N \text{ machos}} = X_i$$

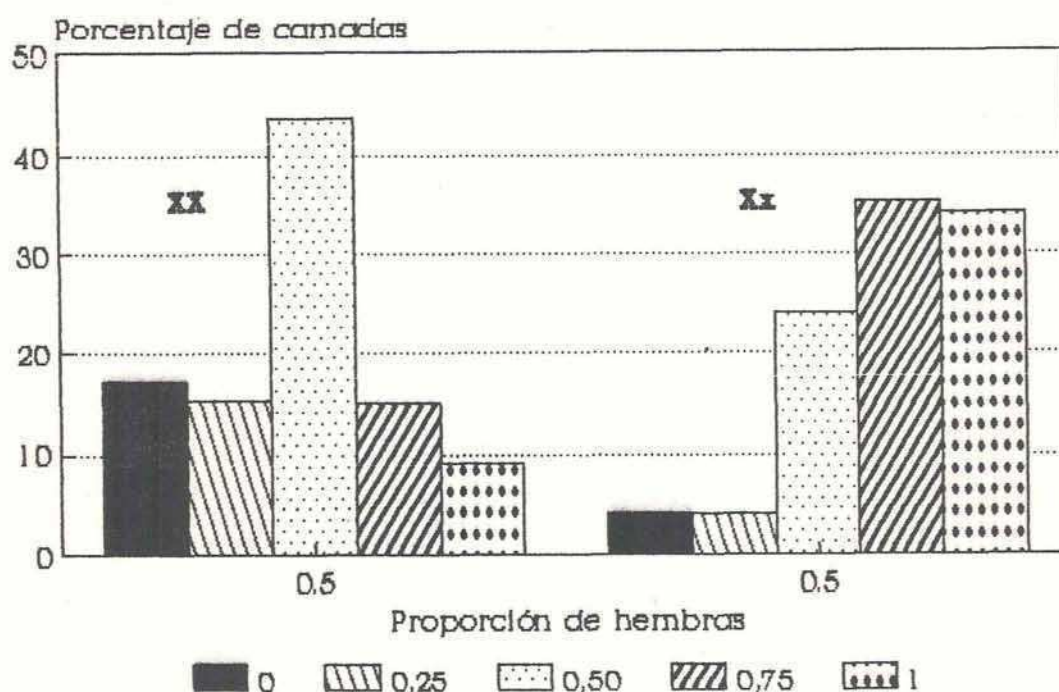
La media se calculó como la suma de X_i / número total de camadas.

La proporción de hembras así calculada resultó de $X = 0,46$ (D.S. 0,29) para las madres XX y de $X = 0,72$ (D.S. 0,26) para las madres Xx.

Las frecuencias en que dicha relación (*) se aleja de 0,5 (50% de hembras) se ilustran en el gráfico 3.2.2-c. Más del 43% de las camadas producidas por las hembras XX respondieron a una relación de 0,5; el 17 % de las camadas estuvieron formadas únicamente por machos y el 9,2% formadas por hembras solamente. El 15% de las camadas tuvieron una proporción de 0,25 y el 15% restante de 0,75.

Por el contrario las hembras Xx producen en la mayoría de sus camadas (70%) únicamente hembras ó su proporción es de 0,75. Sólo el 24% de las camadas respondieron a una relación de 0,5.

FIGURA 3.2.2-C. PROPORCION DE HEMBRAS



En el eje horizontal se grafica la proporción de hembras por camada con valores que corresponden a camadas cuyas crías fueron todas machos (0); 1/4 fueron hembras (0,25); la mitad hembras y la mitad machos (0,5); 3/4 hembras (0,75) y todas hembras (1). En el eje vertical se grafica el porcentaje de camadas que presentaron dichas proporciones. El grupo de barras de la izquierda corresponde a las madres XX y las de la derecha a las madres Xx.

3.2.3. MORTALIDAD PRE-DESTETE

En la progenie de las hembras XX, de 97 machos nacidos se destetaron 58 (mortalidad pre-destete para los machos: 40,2%) y de las 87 hembras nacidas se destetaron 51 (mortalidad pre-destete para las hembras: 41,4%).

Progenie de hembras XX

Total de crías nacidas 184 (100%)

Total de crías destetadas 109 (59,2%)

Mortalidad pre-destete 40,8%

En la progenie de las hembras Xx de 142 machos nacidos se destetaron 101 (mortalidad pre-destete para los machos: 28,9%) y de las 322 hembras nacidas se destetaron 220 (mortalidad pre-destete para las hembras: 31,7%).

Progenie de hembras Xx

Total de crías nacidas 464 (100%)

Total de crías destetadas 321 (69,2%)

Mortalidad pre-destete 30,8%

La mortalidad pre-destete resultó un 10% mayor en la progenie de las hembras XX que en la progenie de las hembras Xx (40,8% y 30,8% respectivamente). En ambos casos la mortalidad pre-destete fue mayor para las hembras que para los machos.

3.2.4. EDAD AL PRIMER PARTO

Las hembras XX producen su primera camada más tardíamente que las hembras Xx. La edad promedio al primer parto fue de 5,7 meses (D.S. 2,1; N=24) para las hembras XX mientras que para las hembras Xx fue de 5,0 meses (D.S. 2,9; N=34) (Tabla 3.2.4).

Tabla 3.2.4 Edad al primer parto

Tipo de hembra	< 3	3 - 6	6 - 9	>9	Total
XX	---	17 (71)	6 (25)	1 (4)	24
Xx	4 (13)	22 (69)	3 (9)	3 (9)	32

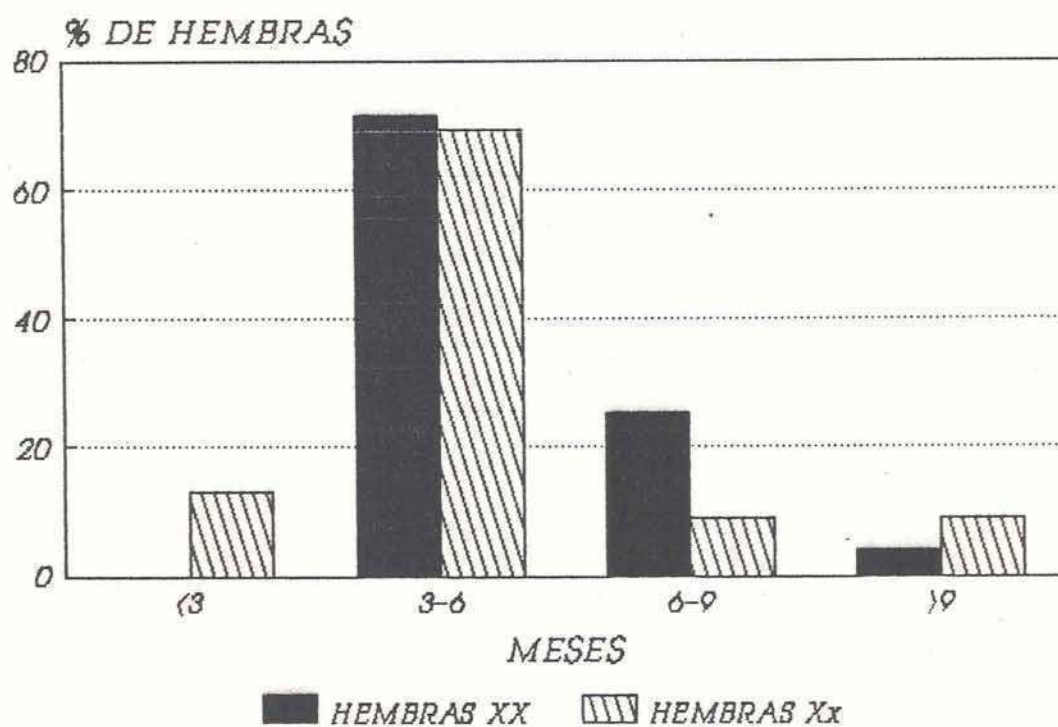
La edad en meses y los valores entre paréntesis son porcentajes.

El 82 % de las hembras Xx presentó su primer parto antes de los seis meses de edad mientras que sólo el 71 % de las hembras XX lo hizo en dicho lapso.

La menor edad registrada al primer parto fue para las hembras XX de 3 meses, teniendo en cuenta el periodo de gestación, aproximadamente a las 9 semanas la hembra fue capaz de preñarse.

Para las hembras Xx la menor edad registrada al primer parto fue de 2 meses, es decir que a las 5 semanas ya fue capaz de preñarse.

FIGURA 3.2.4 EDAD AL PRIMER PARTO



Se ilustra el porcentaje de hembras XX y Xx cuyo primer parto ocurrió a edades de menos de 3 meses, entre 3 y 6 meses, entre 6 y 9 meses y mayores de 9 meses.

3.2.5. EDAD AL ÚLTIMO PARTO

La mayor edad a la que se registró un parto en una hembra XX fue de 22 meses y la mayor edad a la que una hembra Xx parió fue de 27 meses. La edad promedio al último parto fue de 10 meses (D.S. 3,3; N=24) para las hembras XX y de 13,5 meses (D.S. 5,2; N=32) para las hembras Xx.

Tabla 3.2.5. Edad al último parto en los dos tipos de hembras

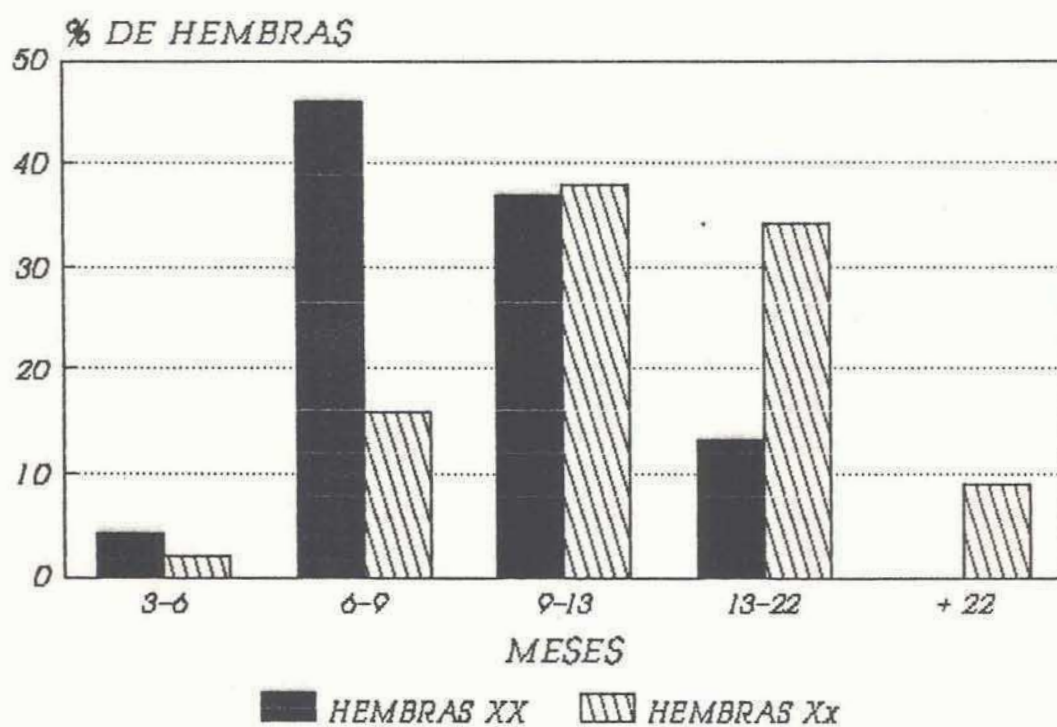
Tipo de Hembra	3 - 6	6 - 9	9 - 13	13 - 22	22 ó más	Total
XX	1 (4)	11 (46)	9 (37)	3 (13)	---	24
Xx	1 (2)	5 (16)	12 (38)	11 (34)	3 (9)	32

La edad en meses y los valores entre paréntesis son porcentajes.

El 50 % de las hembras XX presentaron su último parto entre los 9 y los 22 meses de edad mientras que el 81 % de las hembras Xx lo presentaron entre los 9 y más allá de los 22 meses de edad (figura 3.2.5).

De acuerdo a estos resultados la longitud de la vida reproductiva es mayor para las hembras Xx que para las hembras XX. Las hembras Xx la inician más tempranamente que las hembras XX y la finalizan más tarde que éstas.

FIGURA 3.2.5 EDAD AL ULTIMO PARTO



Se ilustra el porcentaje de hembras XX y Xx cuyo último parto ocurrió a edades de entre 3 y 6 meses, entre 6 y 9 meses, entre 9 y 13, entre 13 y 22, y mayores de 22 meses.

3.2.6. NUMERO DE CAMADAS PRODUCIDAS POR HEMBRA

Es importante considerar la cantidad total de camadas producidas durante la vida reproductiva de ambos tipos de hembras. Por ello se calculó el número medio de camadas producidas por hembra teniendo en cuenta la edad de la hembra al último parto como:

$$\frac{\text{Número de camadas}}{\text{Edad de la hembra al último parto}} \times 100 = X_i$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{N} \quad (**)$$

En la siguiente tabla se muestra el número de camadas producidas por hembra según la constitución cromosómica de las hembras en colonia de laboratorio.

Tabla 3.2.6 Número de camadas producidas por hembra

Tipo de hembra	1 - 3	4 - 5	6 - 7	8 ó más	Total	Número medio de camadas/hembra **
XX	6 (25)	13 (54)	3 (13)	2 (8)	24	1,5 ± 0,6
Xx	3 (9)	8 (25)	9 (28)	12 (38)	32	1,8 ± 0,5

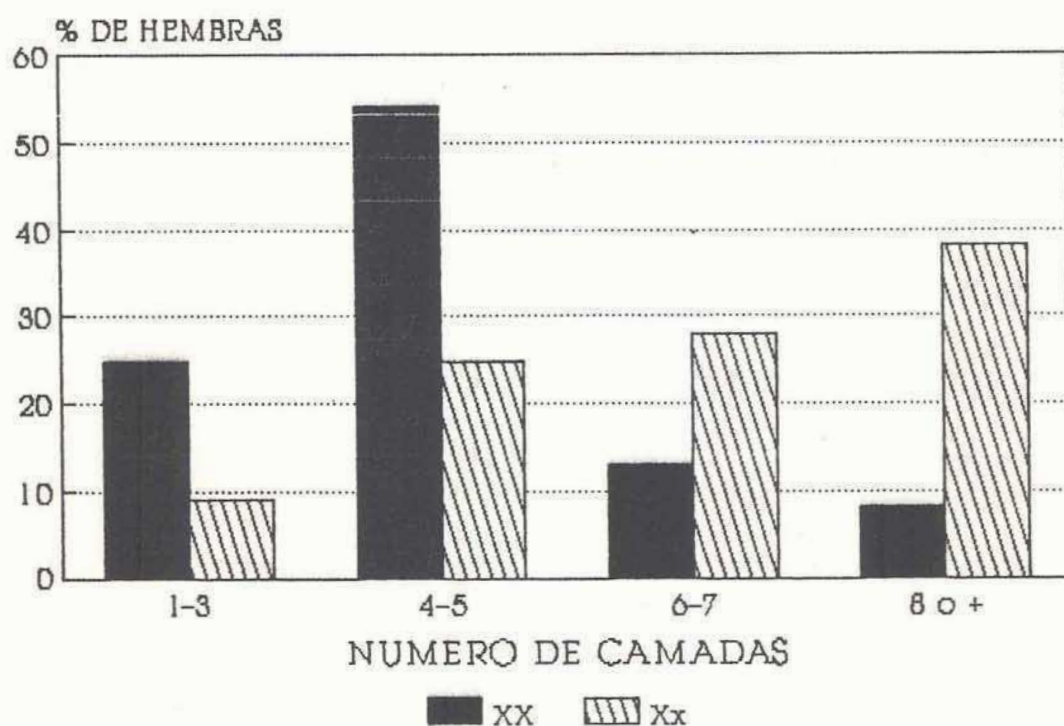
Los números entre paréntesis son porcentajes.

El índice calculado (**) donde se tiene en cuenta la edad de las hembras al último parto, resultó levemente superior para las hembras Xx que para las XX 1,8 frente a 1,5 (teniendo en cuenta los desvíos estos valores se superponen).

Si no se tiene en cuenta la edad de las hembras al último parto, el 79 % de las hembras XX tuvieron hasta 5 camadas y sólo el 21 % de ellas superaron las 6 camadas. En cambio el 66 % de las hembras Xx tuvieron 6 ó más camadas y el 34 % restante tuvieron hasta 5 camadas (figura 3.2.6).

Teniendo en cuenta todas las camadas producidas por cada hembra, las 24 hembras XX mostraron una menor intensidad de reproducción que las 32 hembras Xx analizadas bajo nuestras condiciones de laboratorio.

FIGURA 3.2.6. NUMERO DE CAMADAS PRODUCIDAS



Un 54 % de las hembras XX tuvieron entre 4 y 5 camadas, el 21 % superó las 6 camadas y el 25 % restante no alcanzó las 4 camadas. Las hembras Xx que lograron tener más de 6 camadas representa el 66 % mientras que el 25 % de ellas tuvo entre 4 y 5 camadas; sólo el 9 % no alcanzó las 4 camadas.

3.2.7. INTERVALO ENTRE PARTOS

Se analizaron 63 intervalos entre partos de hembras XX de las cuales se consideraron hasta 9 partos consecutivos y 147 intervalos entre partos de hembras Xx de las que se tuvieron en cuenta hasta 13 partos consecutivos (Tabla 3.2.7).

Tabla 3.2.7 Intervalo entre partos de ambos tipos de hembras (en días).

Tipo de hembra	< 20	21-35	36-60	> 60	Total
XX	2(3%)	29(46%)	23(37%)	9(14%)	63
Xx	2(1%)	84(57%)	49(33%)	12(9%)	147

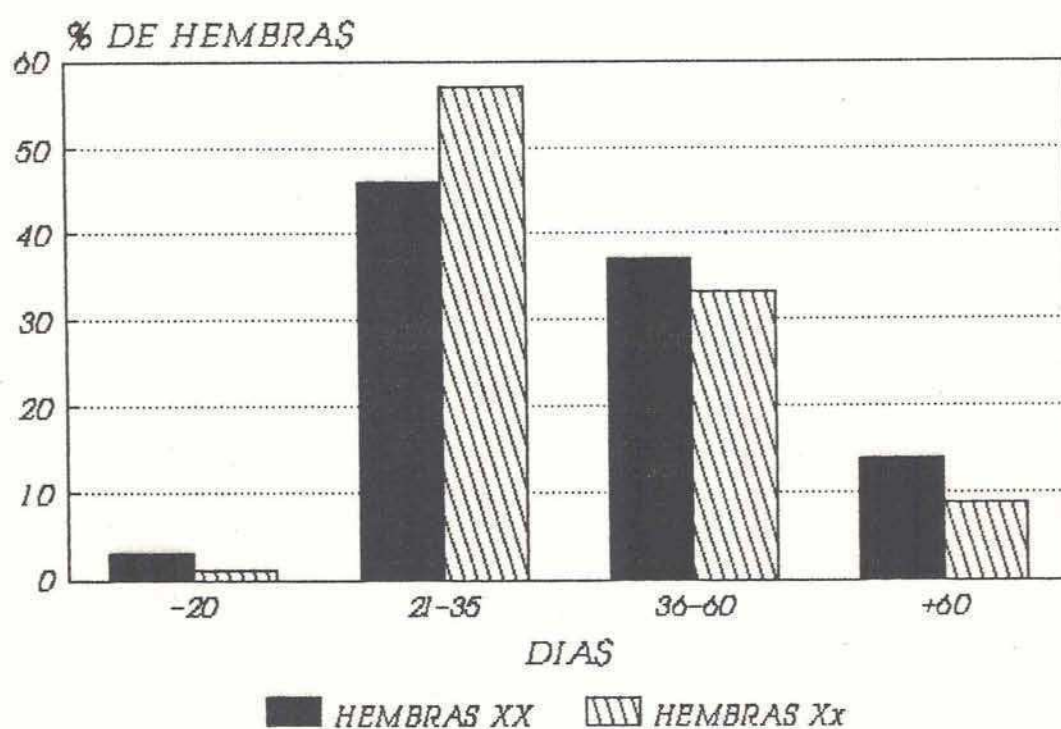
En ambos tipos de hembras el mayor porcentaje de intervalos entre partos correspondió a la preñez por celo post-parto (21-35 días), es decir que el 46 % de los intervalos entre partos de hembras XX corresponde a preñeces ocurridas durante el celo post-parto. Mientras que las hembras Xx presentaron un 57 % de los intervalos entre partos correspondientes al celo post-parto, mostrando un mejor aprovechamiento del celo post-parto.

Estos resultados reflejan que las hembras XX tienen un aprovechamiento menor que las hembras Xx del celo post- parto.

Los partos ocurridos en menos de 20 días del anterior son atribuibles a partos prematuros, estos se han presentado en un bajo número de casos y en proporciones similares en ambos tipos de madres.

Debido al mejor aprovechamiento del celo post-parto por parte de las hembras Xx se explica que el número medio de camadas (parágrafo 3.2.6) producidas por una hembra Xx sea mayor que el de las hembras XX.

FIGURA 3.2.7. INTERVALO ENTRE PARTOS



El intervalo de 21 - 35 días, correspondiente al celo post-parto es aprovechado por un 46 % de las hembras XX y por un 57 % de las hembras Xx.

3.2.8. FECUNDIDAD

La fecundidad en los mamíferos se mide como la producción de crías hembras nacidas vivas (Caughley, 1977). La fecundidad varía con la edad de la hembra y una descripción completa requiere de un cálculo por separado para cada intervalo de vida.

Se analizó la fecundidad en relación a la edad de 21 hembras XX y 20 hembras Xx. Para ello se tuvieron en cuenta el total de crías vivas nacidas debido a que la proporción de hembras/machos es significativamente diferente en la progenie de las hembras Xx (parágrafo 3.2.2.). Para construir la tabla de fecundidad se tomó en cuenta la edad en intervalos de 6 semanas, el número de partos ocurridos y el número de crías nacidas vivas en dicho intervalo de edad (Tabla 3.2.8-a y Tabla 3.2.8-b).

La fecundidad así analizada resultó ser para algunas edades levemente superior para las hembras Xx que para las hembras XX. Para los intervalos de 12 y 18; 36-42; 48-54 y 54-60 semanas los valores fueron mayores para las hembras XX que para las hembras Xx.

También se observó aquí que las hembras Xx continuaron preñándose aún después que las hembras XX dejaron de hacerlo (Figura 3.2.8).

Tabla 3.2.8-a Fecundidad, hembras XX

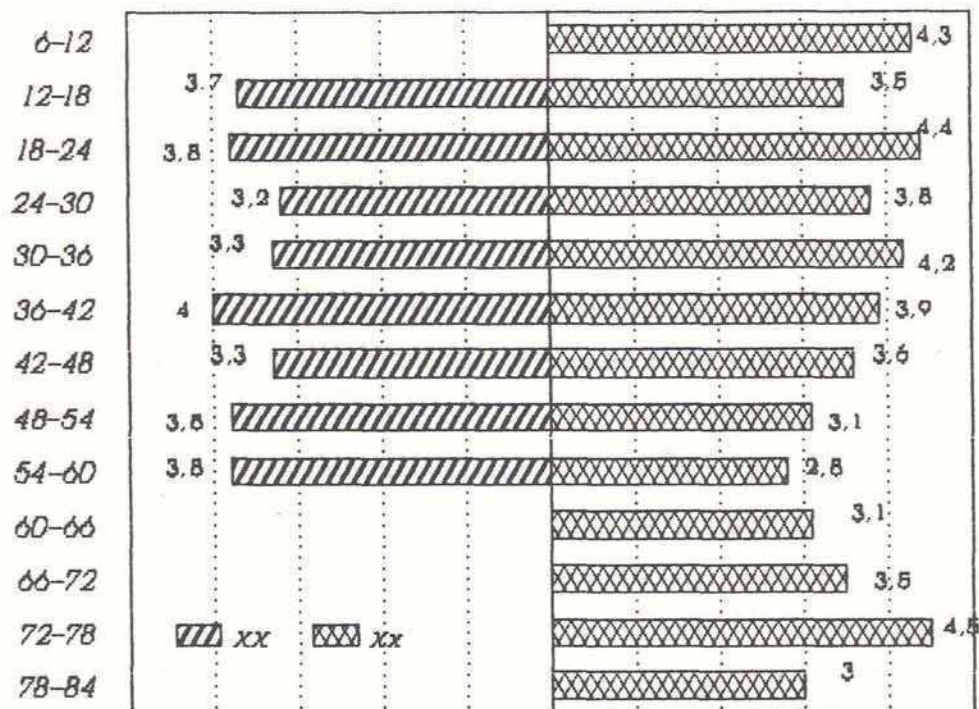
Edad (semanas)	Nº de partos	Nº de crías vivas	\bar{X} (D.S.)
12 - 18	3	11	3,7 (1,5)
18 - 24	13	49	3,8 (1,7)
24 - 30	5	16	3,2 (1,8)
30 - 36	9	30	3,3 (1,9)
36 - 42	7	28	4,0 (1,3)
42 - 48	6	20	3,3 (1,9)
48 - 54	5	19	3,8 (2,3)
54 - 60	4	15	3,8 (1,3)
60 - 66	1	5	-----
66 - 72	1	5	-----
72 - 78	1	3	-----
78 - 84	1	3	-----
84 - 90	1	5	-----

Tabla 3.2.8-b Fecundidad, hembras Xx

Edad (semanas)	Nº de partos	Nº de crías vivas	\bar{X} (D.S.)
6 - 12	4	17	4,3 (1,5)
12 - 18	20	70	3,5 (1,4)
18 - 24	21	92	4,4 (1,4)
24 - 30	21	79	3,8 (1,7)
30 - 36	17	71	4,2 (1,8)
36 - 42	15	58	3,9 (1,7)
42 - 48	14	50	3,6 (2,0)
48 - 54	10	31	3,1 (1,3)
54 - 60	10	28	2,8 (0,3)
60 - 66	8	25	3,1 (1,6)
66 - 72	2	7	3,5 (2,1)
72 - 78	4	18	4,5 (1,7)
78 - 84	2	6	3,0 (1,4)
84 - 90	1	2	-----
90 - 96	1	3	-----

FIGURA 3.2.8. FECUNDIDAD EN AMBOS TIPOS DE HEMBRAS

Semanas



Fecundidad

La fecundidad de las hembras XX no alcanza los valores de la de las hembras Xx excepto para los intervalos de edad de 12 a 18 de 36 a 42 de 48 a 54 y de 54 a 60 semanas en los cuales las hembras XX alcanzaron valores superiores.

3.2.9. TASA DE OVULACION

Se estudió la tasa de ovulación teniendo en cuenta la constitución cromosómica de las hembras debido a que en *A. azarae* podía esperarse un incremento en la tasa de ovulación de las hembras Xx.

Como se ha descripto (parágrafo 3.2.1), la media de camada no mostró diferencias significativas entre ambos tipos de hembras. Debido a que 1/4 de las cigotas se pierde en las madres Xx, esta pérdida podría ser compensada mediante un incremento en la tasa de ovulación. En hembras XO de ratón el número de cuerpos lúteos es algo mayor que en hembras XX (Lyon & Hawker, 1973). También en hembras XO del lemming *Dicrostonyx torquatus* se ha mencionado la posibilidad de un aumento en la tasa de ovulación como mecanismo para compensar la pérdida de cigotas con nulisomia para los cromosomas sexuales (Gileva et al. 1982).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.2.9 Tasa de ovulación en *A. azarae*.

Tipo de hembra	Número de hembras disecadas	Número total de cuerpos lúteos	$\bar{X} \pm$ D.S.
XX	11	73	6,64 \pm 0,67
Xx	7	50	7,14 \pm 0,9

Mediante un test de T se compararon ambas medias y no fue

posible afirmar que existan diferencias estadísticamente significativas.

La variación individual, para ambos tipos de hembras fue de 6 a 8 cuerpos lúteos y no es posible considerar que exista un incremento significativo en la tasa de ovulación en las hembras Xx como mecanismo para compensar la pérdida de cigotas xY.

3.2.10 PERDIDA PRE-NATAL EN HEMBRAS XX Y Xx

La semejanza en el tamaño de camada y la tasa de ovulación observadas en ambos tipos de hembras (parágrafos 3.2.1 y 3.2.9) se muestra contradictoria con la pérdida esperada del 25 % de las cigotas en las hembras Xx. Esta discrepancia puede explicarse al menos en parte mediante la determinación de la pérdida pre-natal.

Se estudió la pérdida pre-natal, tanto en hembras XX como en hembras Xx a través de la autopsia de hembras preñadas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2.10.

La pérdida pre-natal total (pérdida pre-implantación más pérdida intrauterina) resultó ser alta en ambos tipos de madres (42,3% y 43,2%) lo que no parece ser inusual en roedores silvestres (Lidicker, 1973).

Pero mientras que la pérdida pre-natal es semejante para ambos tipos de hembras, la pérdida pre-implantación es un 10 % mayor en las hembras Xx que en las XX. Esto se debe a una mayor pérdida intrauterina observada en las hembras XX.

Tabla 3.2.10 Pérdida pre-natal.

TIPO DE HEMBRA	(N)	CUERPOS LUTEOS (Nro. total)	Nro. EMBRIONES IMPLANTADOS		PERDIDA PRE- IMPLANTACION	PERDIDA PRE- NATAL TOTAL
			VIVOS	ABORTIVOS		
XX	16	104	60 (58%)	12 (11,6%)	32 (30,8%)	44 (42,3%)
Xx	12	88	50 (57%)	2 (2,3%)	36 (41,0%)	38 (43,2%)

TABLA RESUMEN: Parámetros reproductivos de hembras XX y Xx.

	HEMBRAS XX	HEMBRAS Xx
Tamaño de camada	3 a 4 crías	3 a 4 crías
Mortalidad pre-destete	41 %	31 %
Edad al primer parto (promedio)	6 meses	4 meses
Edad al último parto (promedio)	10 meses	13 meses
Longitud de la vida reproductiva	Menor	Mayor
Fecundidad	Semejante	Semejante
Número de camadas en el mismo lapso	Semejante	Semejante
Intervalo entre partos	Mayor	Menor
Celo post-parto	Menor Aprovechamiento	Mayor Aprovechamiento
Proporción de sexos 0/0	0,89 (nacimiento) 0,88 (destete)	2,3 (nacimiento) 2,2 (destete)
Tasa de ovulación	6 - 8	6 - 8
Pérdida pre-natal		
Total	42 %	43 %
Pre-implantación	31 %	41 %

3.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES

La proporción de sexos, tanto al nacimiento como al destete, fue de 1:1 para las hembras XX. En cambio para las hembras Xx se observó una marcada disparidad en favor de las hembras nacidas como destetadas. La proporción de sexos, concuerda con lo esperado si se considera la inviabilidad de las cigotas xY.

Mientras que más del 43 % de las camadas producidas por las hembras XX respondieron a una relación 1:1, sólo el 24 % de las camadas de las madres Xx tuvieron una relación 1:1 ya que la mayoría de las camadas producidas por estas hembras está formada por tres cuartas partes ó únicamente hembras. La alteración de la proporción sexual observada, concuerda con observaciones previas de Lizarralde et al. (1982).

Esta alteración en la proporción de sexos es debida a la letalidad de las cigotas xY, las que probablemente se pierdan tempranamente en la embriogénesis.

Por otro lado no se ha informado una relación de sexos excepcional, con predominio de hembras en poblaciones silvestres donde se ha encontrado una proporción de sexos 1:1 que no cambia significativamente por mes o por habitat (Bianchi et al., 1971; Zuleta, 1989). Este hecho es contradictorio con las observaciones de la proporción sexual de *A. azarae* en cautiverio y probablemente deba ser más estudiado. Tal como ocurre en los lemmings, donde se ha encontrado que en las capturas hay un

excedente de un 67 a un 78% de hembras (Frank, 1966).

En nuestras condiciones experimentales, la mortalidad predestete en la progenie de las hembras XX resultó mayor que en la progenie de las hembras Xx. La longitud de la vida reproductiva fue mayor para las hembras Xx que para las hembras XX, debido a que las hembras Xx presentaron su primer parto más tempranamente y el último más tardíamente que las hembras XX. Teniendo en cuenta la edad de las hembras al último parto la cantidad de camadas producidas fue levemente superior para las hembras Xx que para las hembras XX lo cual refleja el mejor aprovechamiento del celo post-parto observado en las hembras Xx mediante el análisis del intervalo entre partos consecutivos.

En ratón macho hay una cantidad de constituciones cromosómicas que conducen a la reducción de la fertilidad. Por ejemplo las traslocaciones autosoma-autosoma, X-autosoma, Y-autosoma, heterocigosis para una traslocación robertsoniana etc. (De Boer & Searle, 1980).

Debido a que las hembras de **Akodon azarae**, fueron cruzadas con machos cuyo linaje era conocido y para evitar que una reducción de la fertilidad del macho pudiera afectar el análisis de la fertilidad, generalmente se utilizaron para los apareamientos hermanos de camada. Podemos descartar que las diferencias observadas en los parámetros reproductivos se debieran a reducciones en la fertilidad de los machos.

Los parámetros bionómicos estudiados han reflejado que las hembras Xx son más eficaces reproductivamente, este rendimiento reproductivo mayor explicaría la propagación inicial como el mantenimiento del cromosoma x en las poblaciones naturales de *A. azarae*, ya que suponemos que este polimorfismo de cromosomas sexuales habría derivado del mecanismo usual entre los mamíferos (hembras XX y machos XY) y se habría originado ya en poblaciones ancestrales de *A. azarae* manteniéndose luego en especies emparentadas como *A. varius*, *A. boliviensis*, *A. neocenus* y *A. alterus* (Bianchi et al. 1971; Liascovich, 1991; Vitullo et al., 1986)

Aunque no es posible extrapolar los resultados obtenidos en el laboratorio a lo que ocurre en condiciones naturales, sí es posible afirmar que las hembras Xx pueden manifestarse más eficaces reproductivamente en determinadas condiciones tal como se ha observado en nuestra colonia.

Para conocer el valor adaptativo de unas y otras hembras se requiere un trabajo poblacional de campo, el cual permitiría conocer el rol del polimorfismo de cromosomas sexuales en la dinámica poblacional de esta especie.

La media de camada no se ve afectada por la pérdida esperada de cigotas xY y esto no se debe a un aumento en la tasa de ovulación como se ha propuesto para el lemming *Dicrostonyx* (Gileva et al., 1982) sino a una menor pérdida intrauterina por parte de las madres Xx.

Que la pérdida intrauterina sea menor en madres Xx explica dos observaciones: 1) ambos tipos de hembras tienen el mismo tamaño de camada y 2) ambos tipos de hembras tienen en promedio la misma tasa de ovulación.

Si la pérdida pre-natal, preimplantativa y postimplantativa fueran independientes, sería esperable que la media de camada fuera un 25 % menor en la progenie de las hembras Xx debido a la pérdida de cigotas inviables xY. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el tamaño de camada de ambos tipos de hembras.

Otra explicación posible, para justificar el tamaño de camada inalterado, era la de suponer una mayor tasa de ovulación en las hembras Xx. Sin embargo esta hipótesis no pudo ser aceptada ya que ambos tipos de hembras mostraron la misma tasa de ovulación.

De ésta manera la pérdida de cigotas xY se ve compensada por una baja pérdida post-implantativa. Una alta pérdida pre-natal, en las madres Xx tiene lugar antes de la implantación mientras que en las madres XX la misma pérdida pre-natal corresponde a estadios más avanzados de la gestación.

CAPITULO 4

4 LINAJES DE HEMBRAS XX Y Xx

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1 CROMOSOMAS DE CELULAS SOMATICAS

4.1.1.1 NEONATOS

Para la identificación citogenética de los animales de la colonia se utilizó la técnica de biopsia hepática. Para estudiar el cariotipo de animales que se deben mantener vivos para estudios posteriores, existen métodos de cultivo de tejidos (linfocitos de sangre periférica, fibroblastos, epitelios, etc.).

La proliferación de las células en cultivo depende de contar con un estimulante de la división celular adecuado, como lo es la fitohemaglutinina para linfocitos, pero no todas las especies responden a este tratamiento y especialmente los roedores.

La aspiración hepática fue introducida en la medicina a mediados del siglo XIX con el objeto de drenar quistes. Pero el método de biopsia hepática transcutánea por medio de una aguja cortante para obtener un cilindro de tejido para su examen histológico posterior, se introdujo en la década comprendida entre 1930 y 1940 (Iversen & Roholm, 1939; Baron, 1939; Koss et al., 1988).

Los roedores neonatos tienen gran parte de la función eritropoyética centrada en el tejido hepático, lo cual convierte al hígado del recién nacido en un tejido análogo a la médula ósea del adulto para estudios cromosómicos. Como está en activa división, en cultivo no es necesario estimularla. Mediante un cultivo de pocas horas podemos obtener material cromosómico suficiente como para analizar el cariotipo.

La técnica empleada consistió en biopsiar a los recién nacidos antes de las 72 horas de edad (en general es conveniente realizar la biopsia lo más temprano posible pues el índice mitótico decrece con el tiempo).

Se anestesiaron los recién nacidos por congelamiento, en hielo granizado para prevenir el peligro de las hemorragias.

Se realizó la punción y aspiración en la zona hepática en forma estéril y rápidamente. Para ello se utilizó una jeringa de 2 ml con aguja 0,7-0,8 mm cargada con medio de cultivo. Se utilizó medio de cultivo TC 199 suplementado con 15 % de suero fetal bovino y 1 ug/ml de colchicina. El volumen de cultivo final fue de 1 ml.

La suspensión celular así obtenida se colocó en un tubo cónico de 4 ml de volumen, con una pequeña capa de aire superior. Se incubó a 37°C tapado. Luego de una hora y media de incubación y observando la modificación del pH del medio se sacrificó el cultivo. Se centrifugó a 800-1000 rpm y se prosiguió con el sacrificio del cultivo tal como se realiza en la técnica de médula ósea y como se describe en el parágrafo 4.1.1.2.

4.1.1.2 ADULTOS

Para el análisis citogenético de animales adultos se siguió la técnica usual para la obtención de cromosomas de médula ósea.

Se inyectaron los animales intraperitonealmente con una solución de colchicina 100 ug/ml (1 ug/ gramo de peso corporal); entre la hora y media y las tres horas posteriores al tratamiento con colchicina se mató el animal por una sobredosis de éter y se extrajeron los fémures. Se limpiaron bien y se cortaron las epífisis. La médula ósea se extrajo con una jeringa con 1 ó 2 ml de solución hipotónica (KCl 0,075 M) y se colocó en un tubo cónico de centrifuga. Se aspiró y expulso el material mediante una pipeta pasteur hasta obtener una suspensión celular homogénea. Se incubó a 37°C durante 25 minutos. Luego de la incubación se centrifugó a 800-1000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se fijó con fijador de Carnoy (metanol: ácido acético glacial, 3:1) recién preparado.

Usualmente se hicieron dos cambios de fijador centrifugando y resuspendiendo cada vez.

Las preparaciones se hicieron por goteo en portaobjetos limpios y se secaron al aire. Estos preparados se colorearon con Giemsa al 3 % o se utilizaron para posteriores tratamientos de bandeó.

4.1.1.3 BANDAS G Y BANDAS C

Las bandas G se obtuvieron según la técnica de Seabright (1971). Que brevemente consiste en el tratamiento de los cromosomas con Tripsina en una solución al 0,1 % en buffer fosfato (pH 6,8) a temperatura ambiente.

El tiempo de este tratamiento es variable y tiene que ver con la vejez y la calidad de los preparados. Una vez tratados con Tripsina los preparados se colorearon con Giemsa al 3 %.

Las bandas C se obtuvieron mediante la técnica de Sumner (1972) que consiste en tratar preparaciones jóvenes con una solución de HCl 0,2 N luego someterlas a una solución fresca sobresaturada de hidróxido de Bario (Ba(OH)_2) y luego una incubación con solución salina SSC 2X.

Las preparaciones así tratadas se colorean con Giemsa al 3%.

4.1.2 CRÓMOSOMAS DE CELULAS GERMINALES

4.1.2.1 MEIOSIS FEMENINA

Mucha información fundamental sobre cromosomas normales y estructuralmente alterados puede obtenerse por estudios sobre estadios meióticos posteriores a diplotene.

En la mayoría de los mamíferos los ovocitos prosiguen los estadios de la profase meiótica hasta diplotene, muy poco antes o pocas horas después del nacimiento (Zuckerman, 1960). El número total de ovocitos por hembra queda determinado al nacimiento, después ya no se formará ningún ovocito. Después de diplotene los ovocitos entran en el estadio de dictiotene y permanecen por un largo periodo hasta poco antes de la ovulación.

En la mayoría de las especies de mamíferos los estadios de la meiosis entre diacinesis y la metafase de la segunda división ocurren en el breve periodo entre la estimulación del folículo de Graaf por la hormona luteinizante (LH) y la ovulación, unas pocas horas después. La anafase y la telofase de la segunda división meiótica ocurre después de la penetración del espermatozoide en la fertilización (Edwards, 1962).

Así es que para encontrar los estadios tempranos de la meiosis los ovocitos deben tomarse de fetos tardíos o animales recién nacidos, en cambio en los ovocitos tomados de ovarios adultos pueden encontrarse los estadios tardíos de la meiosis.

Ovocitos que están naturalmente en diacinesis o estadios posteriores pueden recojerse justo antes de la ovulación pero el número de tales ovocitos es muy pequeño.

El análisis de la diacinesis-metafase I se realizó tanto en hembras XX y Xx por cultivo "in vitro" de ovocitos (Henderson y Edwards, 1968). Las preparaciones cromosómicas se hicieron como lo describe Tarkowski (1966).

Los ovocitos fueron relevados de los folículos grandes, lavados en medio de cultivo, sometidos a la acción de la hialuronidasa para dispersar las células del cúmulo, lavados en medio de cultivo e incubados en microgota de suero fetal bovino durante 5 horas.

Luego fueron expuestos a hipotonía de citrato de sodio 1 % y colocados en portaobjetos donde se fijaron con una pequeña gota de fijador de Carnoy, las preparaciones se colorearon con Giemsa y las figuras meióticas se fotografiaron con película Kodalith (Kodak) en fotomicroscopio.

A continuación se detalla la técnica utilizada. Siguiendo los protocolos de cultivo "in vitro" de ovocitos (Henderson & Edwards, 1968; Tsuchida & Uchida, 1975) y obtención de cromosomas (Tarkowski, 1966) descriptas originalmente para *Mus musculus* se adaptó el siguiente protocolo para *A. azarae*.

Se disecaron las hembras y lavaron los ovarios en MEM (Medio esencial mínimo de Eagle) y 5 % de ST (suero de ternera). Se recolectaron los ovocitos por punción mecánica de los folículos; seleccionando los ovocitos cultivables es decir los ovocitos con

vesícula germinal no rodeados por células de la corona y rodeados por células de la corona. Una vez seleccionados los ovocitos cultivables, aquellos que se hallaban rodeados por células de la corona se incubaron en 1 ml de hialuronidasa (50 UI/ml) a 37°C durante 1 ó 2 minutos para dispersar las células de la corona lo cual se controló bajo lupa. Para eliminar la enzima se realizaron dos lavados en MEM.

Luego los ovocitos elegidos para cultivo se lavaron en SFB (suero fetal bovino) puro y se cultivaron en una microgota (400 µl) de SFB cubiertos por vaselina líquida en placa plástica ("Falcon") durante 5 horas a 37°C.

Después del cultivo, los ovocitos se pasaron a una solución hipotónica de citrato de sodio al 1 % durante 20 minutos a 37°C.

Se traspasaron como máximo unos 6 ovocitos, en un volumen mínimo de solución de citrato de sodio al 1 % (2 ó 3 µl) al centro de un portaobjetos limpio.

Allí se fijaron con una pequeña gota de fijador frío, metanol-ácido acético glacial (3:1). Se dejaron secar al aire y se colorearon con colorante Giemsa al 3% durante 4 minutos.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 LOS CROMOSOMAS DE *Akodon azarae*.

Esta especie presenta $2n=38$ cromosomas, siendo el par autosómico más chico metacéntrico y los demás autosomas telocéntricos. El cromosoma X es subterminal y el Y es telocéntrico (figura 4.2.1-a, y figura 4.2.1-b). Las hembras heteromórficas para el par sexual presentan un X subterminal grande, y un pequeño cromosoma similar al Y de los machos (figura 4.2.1-c). Este pequeño cromosoma que se observa en las hembras heteromórficas es el que fue considerado como un X con una gran delección (Bianchi & Contreras, 1967).

FIGURA 4.2.1-A. METAFASE SOMATICA, MACHO $2N = 38$. (Las flechas indican los cromosomas X e Y).

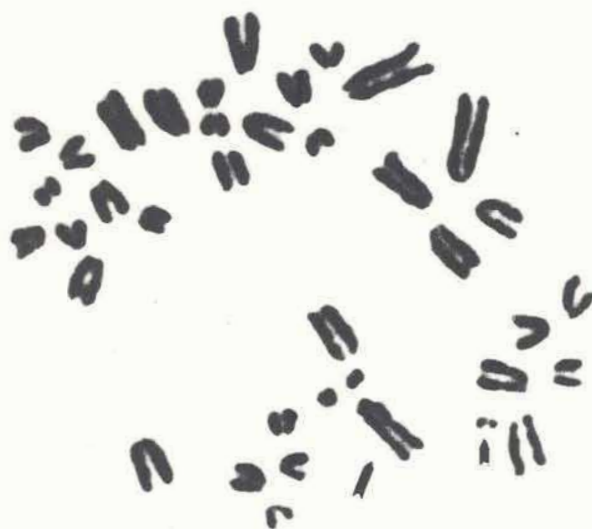


FIGURA 4.2.1-B. METAFASE SOMATICA, HEMBRA $2N = 38$. (Las flechas indican los cromosomas X).

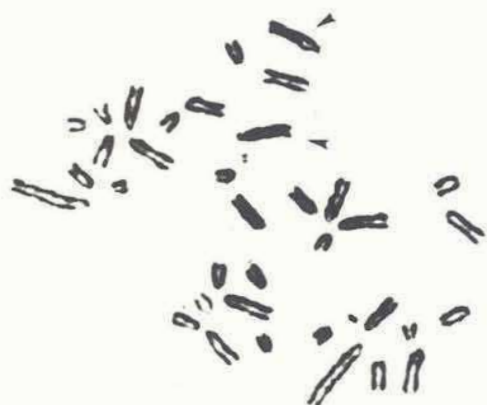


FIGURA 4.2.1-C. METAFASE SOMATICA, HEMBRA $2N = 38$ CON HETEROMORFISMO DE PAR SEXUAL. (Las flechas indican los cromosomas X y x).



4.2.2 RENDIMIENTO DE LA TECNICA DE BIOPSIA HEPATICA EN LA DETERMINACION DEL CARIOTIPO DE NEONATOS

Las experiencias de determinación del tipo de cromosomas sexuales que portan las hembras, realizadas durante 24 meses fueron utilizadas para evaluar el rendimiento de dicha técnica (parágrafo 4.1.1.1).

De 111 hembras recién nacidas, se obtuvieron metafases analizables en 82 de ellas (un 74 %) las 29 restantes no presentaron metafases o bien éstas no pudieron ser analizadas por la calidad de los preparados obtenidos. La calidad de los preparados que pueden obtenerse mediante esta técnica se ilustra en la figura 4.2.1-b ó -c.

Si bien el rendimiento es muy bueno, teniendo en cuenta la calidad de los preparados en cuanto a la abundancia de metafases se observó que en general el número de metafases es bajo, las mejores preparaciones permitieron analizar unas 8 a 10 metafases por preparado.

El cariotipo de las hembras mantenidas vivas para los estudios de los parámetros reproductivos fue posteriormente corroborado mediante el análisis citogenético de médula ósea (parágrafo 4.1.1.2).

4.2.3 ANALISIS DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

El patrón de bandas G de *A. azarae* se muestra en la figura 4.2.3-a. Mediante el análisis y comparación del patrón de bandas G del cromosoma X de machos, hembras XX y hembras Xx no fue posible identificar ningún tipo de reordenamiento que afectara al cromosoma X. Sin embargo no es posible descartar que exista algún reordenamiento que afecte al cromosoma X no detectable mediante la técnica de bandeo G.

El tratamiento con hidróxido de Bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2$), para la obtención de bandas C mostró tanto en machos como en ambos tipos de hembras, una escasa cantidad de cromatina C-positiva. Sin embargo es de destacar la observación de dos bandas C-positivas intercalares, presentes en el cromosoma X (figura 4.2.3-b). Este hecho podría deberse a que el tratamiento utilizado ha sido suave, pero indudablemente la estructura de la cromatina tanto en los centrómeros de la mayoría de los autosomas así como en dichas bandas intercalares del cromosoma X ha de ser más compacta que en el resto del complemento.

FIGURA 4.2.3-A: PATRON DE BANDAS G EN *A. azarae* (macho $2n = 38$).



FIGURA 4.2.3-B: PATRON DE BANDAS C EN *A. azarae* (macho $2n = 38$;
las flechas indican los cromosomas X e Y)



4.2.4 PROPORCION DE HEMBRAS XX Y Xx EN LA DESCENDENCIA DE HEMBRAS Xx.

Se estudió el cariotipo de hembras recién nacidas con el objeto de determinar cuál es la proporción de hembras que presentan heteromorfismo del par sexual al nacimiento.

La descendencia de 21 madres Xx de las que se analizaron 34 camadas arrojó los resultados que se indican en la tabla 4.2.4.

Tabla 4.2.4

Total de crías hembras nacidas	XX	Xx
95	43 (45%)	52 (55%)

Mediante un test de Chi² se observó que las diferencias entre las frecuencias observadas y las esperadas si la relación correspondiera a 1:1 no son significativas; por lo tanto la relación de hembras XX/ hembras Xx corresponde a 1:1.

Es decir que al nacimiento, las hembras descendientes de madres Xx son la mitad XX y la mitad Xx.

Por otro lado es importante destacar que nunca se han observado hembras Xx en la progenie de hembras XX.

4.2.5 ESTUDIOS CITOGENETICOS EN HEMBRAS PROVENIENTES DE CAMPO

Se analizaron 26 hembras provenientes de campo, capturadas en San Pedro, provincia de Buenos Aires.

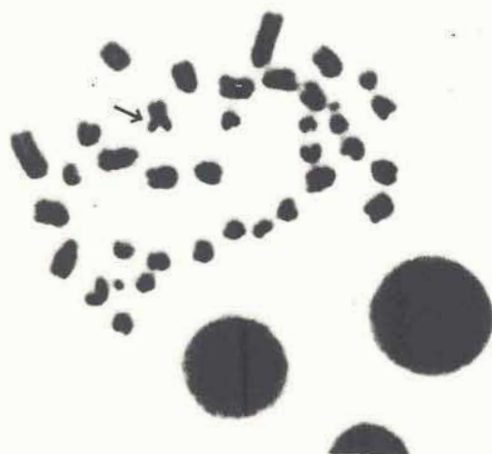
De las 26 hembras 25, presentaron un cariotipo $2n = 38$ y una hembra resultó $2n = 37$ debido a la presencia de una fusión autosómica (figura 4.2.5).

En cuanto a la constitución cromosómica sexual, 13 de las 26 hembras resultaron Xx y 13 XX .

También se encontraron hembras Xx *A. azarae* en capturas realizadas por diferentes motivos en San Miguel del Monte y Monte Hermoso (Provincia de Buenos Aires) y en El Palmar (Provincia de Entre Ríos).

Corroborando de esta manera la existencia del heteromorfismo de cromosomas sexuales en las hembras de esta especie en poblaciones naturales.

FIGURA 4.2.5: METAFASE SOMATICA DE UN EJEMPLAR HEMBRA QUE PRESENTO $2N = 37$ DEBIDO A UNA FUSION AUTOSOMICA (Indicada por la flecha).



4.2.6 RESULTADOS DE LA MEIOSIS EN LAS HEMBRAS

4.2.6.1 PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE OBTENCION DE CROMOSOMAS MEIOTICOS EN HEMBRAS

Se disecaron 12 hembras de entre 13 y 220 días de edad, se recolectaron ovocitos mediante la técnica descrita en el parágrafo 4.1.2.1, y se hizo el recuento de ovocitos cultivables y no cultivables. Se observó un mejor rendimiento de la técnica en hembras jóvenes, hasta 40 días de edad.

En hembras mayores no siempre pudieron recuperarse ovocitos y cuando se lograron recuperar siempre disminuyó la cantidad relativa de ovocitos cultivables y también la respuesta positiva al cultivo.

En la tabla 4.2.6.1 se muestran los resultados obtenidos en la obtención de figuras meióticas a partir del cultivo de ovocitos.

Tabla 4.2.6.1

Edad (días)	No de Hembras disecadas	Se obtuvieron ovoc. cultiv.	No de ovocitos cultivables	No de fig. meióticas
13-40	6	5 (83 %)	197 (40/0) +	31
40-220	6	3 (50 %)	68 (23/0) +	8

4.2.6.2 ANALISIS DE LA MEIOSIS DE LAS HEMBRAS

Las bien conocidas dificultades en el estudio de la meiosis de las hembras en mamíferos sólo han permitido investigar la meiosis en 17 ovocitos de 3 hembras.

El análisis de éstos ovocitos después del cultivo "in vitro" descrito en el parágrafo 4.1.2.1, mostró la presencia de un bivalente heteromórfico claramente identificable.

Dicho bivalente está formado por un elemento largo y un elemento corto los que a menudo están asociados en forma terminal, en algunos casos mostraron un claro quiasma terminal. El tamaño de los componentes de este bivalente heteromórfico concuerda con el de los cromosomas X y x.

En la figura 4.2.6.2-a se ilustra la metafase I de un ovocito proveniente de una hembra *A. azarae* Xx (complemento cromosómico determinado por análisis citogenético de médula ósea), un bivalente heteromórfico, señalado por la flecha, está formado por un elemento largo y un elemento muy pequeño que corresponden a los cromosomas X y x.

En la metafase I que se ilustra en la figura 4.2.6.2-b se observan 19 bivalentes simétricos los que corresponden a la meiosis de una hembra XX "normal".

FIGURA 4.2.6.2-A: METAFASE I, HEMBRA $2N = 38$; COMPLEMENTO CROMOSOMICO SEXUAL Xx. La flecha indica el bivalente asimétrico.

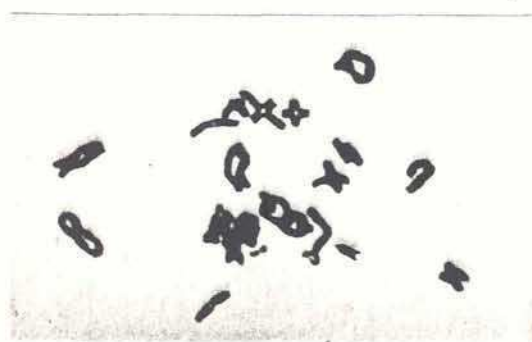


FIGURA 4.2.6.2-B: METAFASE I, HEMBRA $2N = 38$; COMPLEMENTO CROMOSOMICO SEXUAL XX "NORMAL". Se observan 19 bivalentes simétricos.



4.3 SINTESIS Y CONCLUSIONES

La necesidad de mantener e identificar los dos linajes cariotípicos de hembras *A. azarae* fue cubierta mediante la técnica de obtener por biopsias hepáticas el cariotipo de los neonatos. El rendimiento de dicha técnica resultó muy bueno teniendo en cuenta la conocida dificultad de obtener progresos en los cultivos de sangre periférica de roedores, lo que impide hallar células en división para observar metafases. La restricción que ofrece el cultivo de biopsias hepáticas es que debe hacerse en los recién nacidos, pero la técnica es sencilla y ocasiona un daño o muerte de los animales mínimo.

Si bien por la calidad de los preparados citogenéticos que se obtienen esta técnica no es útil para tratamientos de bandeo, es perfectamente utilizable para analizar el cariotipo a nivel alpha. Esto permitió mantener animales cuyo cariotipo ya era conocido antes del destete.

Debido a que en uno de los antecedentes conocidos, el roedor *Myopus schisticolor*, las hembras que presentan heteromórfico el par sexual (X*Y) muestran mediante bandeos G, que el X* que portan las hembras heteromórficas y el X de las hembras "normales" tienen diferencias en el patrón de bandas G de sus brazos cortos (Herbst et al., 1978). Se pensó que en *A. azarae* podría ocurrir algo similar, sin embargo no se pudieron detectar diferencias en los patrones de bandeo G de los cromosomas X

(tanto de hembras Xx y XX como machos XY). No es posible descartar que exista algún tipo de reordenamiento no evidenciable por bandeo G. Tal vez de existir algún reordenamiento, pueda ser visualizado mediante otras técnicas de bandeo, especialmente las relativamente nuevas técnicas de bandeo de alta resolución (Verma & Babu, 1989).

La presencia de bandas C intercalares en los cromosomas X de esta especie, no había sido observada previamente, probablemente se trate de un polimorfismo de heterocromatina sin ningún efecto sobre el mecanismo de determinación del sexo.

Los resultados obtenidos en cuanto a la proporción de hembras XX y Xx en la descendencia de las madres Xx, mostraron que al nacimiento, la mitad aproximadamente portaron el cromosoma x materno. esto fue una primera indicación de que el cromosoma x estaba normalmente en los ovocitos de las hembras Xx.

Mediante el análisis de la meiosis de las hembras, se comprobó la formación de un bivalente heteromórfico, indicando de esta manera que no existe ningún evento de no-disyunción que impida la formación de gametas portadoras del cromosoma x. Por otro lado este fenómeno también es diferente a lo que ocurre en la meiosis del lemming *Myopus schisticolor* donde por un evento de no-disyunción las gametas de las hembras X*Y sólo portan el cromosoma X* (Fredga et al., 1976).

Tal como fue previamente observado por Lizarralde et al. (1982) nunca se encontraron hembras Xx en la descendencia de

madres XX. Permitiendo agregar más elementos de juicio en detrimento de la hipótesis propuesta acerca del origen del elemento x, como un mecanismo de compensación de dosis sexual desde la inactivación de un cromosoma X completo hasta su eliminación, pudiendo producir hembras XO y Xx (Bianchi & Contreras, 1967; Bianchi, 1973).

Los estudios citogenéticos en hembras *A. azarae* provenientes de capturas en poblaciones naturales de la provincia de Buenos Aires, permitieron corroborar la existencia de hembras heterogaméticas en las poblaciones naturales de esta especie. El hallazgo de un animal $2n=37$ debido a una fusión autosómica es coherente con las conocidas evidencias de que en los Akodontinos existe una importante tendencia a presentar mecanismos Robertsonianos en la modificación de sus cariotipos (Liascovich, 1991).

CAPITULO 5

DISCUSION

Los mamíferos son conocidos por su mecanismo de determinación del sexo altamente conservado, los machos son heterogaméticos y las hembras homogaméticas. El cromosoma X es homólogo desde los marsupiales hasta los placentarios (Ohno, 1967 y 1979; Cooper et al., 1975; Bull & Bulmer, 1981). Como se ha mencionado en la introducción del presente trabajo, la aparición de hembras heterogaméticas es un hecho muy poco frecuente, pero en particular existen en poblaciones naturales de varias especies de roedores (Rausch & Rausch, 1972; Fredga et al., 1976; Gileva & Chebotar, 1979).

En 1967, Bianchi & Contreras dieron a conocer el cariotipo de *Akodon azarae*. En aquella oportunidad, encontraron en las hembras un polimorfismo de cromosomas sexuales debido al cual algunas hembras presentaban un cariotipo indistinguible del de los machos, este hecho fue interpretado como una gran deleción del brazo largo de uno de los cromosomas X (Bianchi & Contreras, 1967; Bianchi et al., 1968).

FIGURA 5.1 Patrón de herencia de los cromosomas sexuales

H E M B R A S					
SOMA		XX		Xx	
GAMETAS		X	X	X	x
M A C H O S	X	XX	XX	XX	Xx
	Y	XY	XY	XY	xY (**)
Proporción de sexos secundaria		0,5		0,67	
Proporción de hembras/ machos		1/1		2/1	
Tamaño de camada esperado		100 %		75 %	

(**)Cigotas xY inviables.

En la progenie de las hembras Xx se esperaría una reducción del 75% en el tamaño de camada así como una relación de sexos de 2 hembras por cada macho por la pérdida de cigotas xY.

Para el mantenimiento y cría en laboratorio de *A. azarae* han sido estudiados los parámetros básicos de esta especie. Muchos de ellos son similares a los conocidos para otros roedores cricetidos criados en laboratorio como el promedio de crías por camada, la duración de la gestación, la presencia de celo post-parto, los parámetros de crecimiento post-natal y la falta de secuencia y periodicidad en los cuadros colpocitológicos (De Villafañe, 1981; Hodara et al., 1984 y 1989; Justines & Johnson, 1970; Mello & Mathias, 1987; Merani & Lizarralde, 1980; Montoro et al. 1987; Roldán et al., 1984).

El mantenimiento y cría de esta especie con la finalidad de producir animales a ser utilizados para profundizar el estudio del mecanismo de determinación del sexo, ofrece buenas posibilidades pese a que la baja productividad observada puede ser un inconveniente. Sin embargo esta baja productividad ha ido subsanándose con algunas generaciones de cría y es factible pensar que si se persiste en su mantenimiento y cría podrá elevarse la productividad sustancialmente.

La posibilidad que se ha indagado de obtener superovulación en hembras *A. azarae* permitirá estudiar si existe o está impedida la fertilización de ovocitos portadores del cromosoma x por espermatozoides Y, también el subsecuente estudio del grado de viabilidad de las cigotas xY las que probablemente no superan el estadio de dos células (donde ocurre activación del genoma embrionario). El conocimiento del método de superovulación para esta especie permitirá entonces el análisis de la fertilización y desarrollo embrionario temprano de *A. azarae* especialmente en cuanto al destino de las posibles cigotas xY ya que para el estudio de preparaciones cromosómicas de embriones, es necesario inducir superovulación en las hembras. Luego se las aparea y de esta forma es posible estudiar un número significativo de cigotas de los primeros estadios de clivaje (Kaufman, 1973).

Para ratón el 60 % de la variabilidad que se observa en la longitud de la cola se debe a diferencias genéticas aditivas, en cambio el tamaño de camada tiene una heredabilidad de sólo el 15% (Falconer , 1960).

Generalmente los caracteres que son más esenciales para la supervivencia de un organismo (por ejemplo, la velocidad de concepción o el tamaño de camada) muestran una heredabilidad baja, ya que sólo pueden tolerarse pequeñas diferencias hereditarias y si éstas son superiores disminuye la supervivencia. Por otra parte, los caracteres que no afectan la

supervivencia en grado importante (por ejemplo la longitud de la cola en ratones) pueden tolerar considerables diferencias genéticas sin causar la muerte o la extinción.

El número promedio de crías por parto para **A. azarae** informado para poblaciones naturales es de 5 (Zuleta, 1989) y en laboratorio este promedio fue de 3 a 4 crías, la disminución observada con respecto a los datos de campo ocurre por igual para ambos tipos de hembras (no es un hecho inusual en roedores silvestres la disminución del tamaño de camada cuando se los introduce a criadero).

Para explicar el tamaño de camada inalterado entre hembras XO y hembras con dos X en el Lemming **Dicrostonyx torquatus** se ha propuesto un incremento en la tasa de ovulación por parte de las hembras XO como forma de compensar la pérdida de cigotas OY (Gileva et al., 1982). Sin embargo un aumento en la tasa de ovulación (de la cual depende el tamaño de camada) es poco probable entre hembras emparentadas.

Al observar una situación similar en **A. azarae** en cuanto al tamaño de camada inalterado entre ambos tipos de hembras, no reflejando la pérdida de cigotas xY, se indagó la posibilidad de que en esta especie también hubiera un incremento en la tasa de ovulación como la observada para el lemming **Dicrostonyx**. No pudo hallarse un incremento significativo en la tasa de ovulación por

parte de las hembras Xx **A. azarae**, en ambos tipos de hembras el número de cuerpos lúteos observados fue el mismo.

Las observaciones hechas sobre el tamaño de camada inalterado, y la misma tasa de ovulación pueden explicarse a condición de que la compensación por la pérdida de cigotas xY (de las hembras Xx) sea en gran parte un proceso automático. Un proceso automático debido a la reducción de la competencia entre los embriones sobrevivientes.

Un análisis teórico hecho por Bulmer (1988) en relación al sistema genético propuesto por Gileva (1987) para **Dicrostonyx**, muestra que una compensación automática como propiedad del sistema reproductivo, es mucho más explicativa que una compensación evolutiva como sería un incremento en la tasa de ovulación aplicable a las observaciones hechas para el lemming **Dicrostonyx**.

El análisis de la pérdida pre-natal en **A. azarae** está de acuerdo con las predicciones teóricas hechas para el lemming **Dicrostonyx** (Bulmer, 1988) ya que se observó la misma pérdida pre-natal total en ambos tipos de hembras (XX y Xx) pero sin embargo la pérdida pre-implantación fue mayor para las madres Xx. Esta pérdida pre-implantación, un 10 % mayor para las madres Xx refleja la pérdida de cigotas inviables xY.

La dificultad en la propagación inicial y la subsecuente mantención de hembras Xx (o XY) en poblaciones naturales, podría llevar a una función con severos defectos asociados a la pérdida de gran parte del cromosoma X. Debido a que la inactivación de uno de los dos X en hembras de mamíferos no es absoluta puesto que ambos están activos en ciertos estadios de la ovogénesis y tempranamente en la embriogénesis. El rendimiento reproductivo en *Mus* XO (que aparece rara vez debido a la no disyunción de los cromosomas sexuales en las células germinales parentales) está enormemente reducido en comparación con el de hembras XX (Lyon & Hawker, 1973).

Si la capacidad reproductiva de las hembras Xx *A. azarae* estuviera reducida, la diseminación del cromosoma x en las poblaciones estaría restringida y se prevendría la fijación evolutiva de la constitución Xx en las hembras.

Para explicar el mantenimiento de hembras heterogaméticas en las poblaciones naturales de estos roedores, es necesario aceptar que las hembras heterogaméticas presentan alguna ventaja selectiva frente a las homogaméticas o al menos presenten el mismo valor adaptativo. Los parámetros reproductivos son el componente más importante del "fitness" y la comparación de dichos parámetros nos permite explicar el mantenimiento del sistema de determinación del sexo en *A. azarae*.

En *A. azarae* no hemos podido observar una reducción en el rendimiento reproductivo de las hembras Xx sino por el contrario éste ha sido mayor al compararlo con el de las hembras XX.

El hecho de que el rendimiento reproductivo de las hembras Xx sea mayor que el de las hembras XX refleja al menos en parte porque existe este polimorfismo de cromosomas sexuales en *A. azarae* (el cual existe muy probablemente también en especies relacionadas).

Como se observa en la figura 5.1 además de una reducción del tamaño de camada en un 75 % en la progenie de las hembras Xx (por pérdida de cigotas xY), en generaciones sucesivas una cuarta parte de las gametas x se perdería justamente por la muerte temprana de las cigotas xY. De tal modo que podría esperarse que la constitución Xx sería cada vez menos frecuente. Si partiendo de una población en la que la mitad de las hembras fueran XX y la otra mitad Xx, y suponiendo un sistema de apareamiento al azar, en la siguiente generación habría sólo un cuarto de hembras Xx y en la siguiente sólo un octavo de las hembras portarían la constitución Xx. De este modo podría esperarse que la constitución Xx no se habría fijado evolutivamente en las poblaciones naturales.

Pero para explicar que ambos tipos de hembras se han capturado y se siguen encontrando en poblaciones naturales con frecuencias elevadas es necesario suponer que el heteromorfismo de cromosomas sexuales se ha fijado evolutivamente.

Para comprender la relación entre el heteromorfismo de cromosomas sexuales y la dinámica poblacional de estos roedores es necesario abordar un estudio de las frecuencias genotípicas en las poblaciones naturales.

La existencia de hembras heterogaméticas en **A. azarae** no es la única entre los mamíferos. Hasta ahora se conocen los lemmings (**Myopus** y **Dicrostonyx**) y otros roedores en cuyas poblaciones naturales coexisten hembras cuyos cromosomas sexuales son heteromórficos.

Hembras fértiles XY han sido muy estudiadas en el "wood lemming" **Myopus schisticolor** (Herbst et al., 1978; Fredga et al., 1976 y 1977; Gropp et al., 1976; Winking et al., 1981). en el caso de **Myopus** se demostró que la mutación ligada al X (llamada X*) suprime el efecto de determinación de masculinidad del cromosoma Y. Las hembras X*Y tienen ovocitos con una constitución X*X* ortodoxa en diacinesis; lo cual se ha explicado mediante la suposición de una no-disyunción en las oogonias u ovocitos resultando en la pérdida del cromosoma Y en las células germinales. Ese es el motivo por el cual las hembras X*Y, al producir únicamente ovocitos portando el X* tienen una descendencia constituida únicamente por hembras.

Se estudió la posibilidad de que un mecanismo semejante al descrito en *Myopus* estuviera actuando en *A. azarae*. Sin embargo dos hechos importantes hacen que el mecanismo involucrado en la determinación del sexo en *A. azarae* sea muy diferente al que actúa en *Myopus*.

Las hembras heterogaméticas (Xx) de *A. azarae* tienen importantes diferencias con aquellas hembras X*Y del lemming *Myopus schisticolor*. La progenie de las hembras Xx *A. azarae* está formada tanto por hembras como por machos y de ello se desprende que en el cromosoma X no hay ninguna mutación que impida la expresión del o los genes responsables de la diferenciación de testículos, los machos hijos de hembras Xx son fértiles e indistinguibles fenotípicamente de los hijos de madres XX.

Por otro lado la descendencia femenina de hembras Xx está formada por hembras fértiles tanto XX como Xx, lo cual es una primera evidencia de que las células germinales de dichas hembras portan tanto el cromosoma X como el x.

Este hecho se ha corroborado mediante el estudio de la meiosis en las hembras. En las células germinales de las hembras Xx no existe ningún mecanismo de no-disyunción, lo que se ha verificado por la presencia de un bivalente heteromórfico en la metafase I. Las hembras Xx de *A. azarae* producen ovocitos con el cromosoma X y ovocitos con el cromosoma x. Más bien la situación es similar a lo que ocurre en el lemming *Dicrostonyx torquatus* donde ambos cromosomas, el X "normal" y el X^m (mutado) están

presentes en los ovocitos (Gileva & Chevotar, 1979).

El hecho de presentar este heteromorfismo de cromosomas sexuales, no ocasiona ninguna disminución en la reproducción de las hembras Xx como de ha observado al comparar los parámetros reproductivos de ambos linajes de hembras en la colonia de laboratorio.

Sin embargo los datos de tamaño de camada de hembras cromosómicamente mutadas, usualmente reflejan la muerte durante el desarrollo en el útero de fetos genéticamente desvalanceados. La constitución XO por sí sola, ya permite suponer que la calidad de los ovocitos es o puede ser una causa de la reducción del tamaño de camada. Además de la muerte temprana de fetos OY durante los dos primeros estadios de clivaje (De Boer & de Jong, 1989).

Podríamos sospechar que las hembras Xx *A. azarae* podrían comportarse en forma semejante al ratón XO por carecer al menos de gran parte de uno de los cromosomas X.

Estudios histológicos cuantitativos en ratón revelaron que la mayoría de los ovarios XO son normales al final de la vida fetal (Burgoyne & Baker, 1981), pero luego del nacimiento han perdido la mitad de los ovocitos en comparación con los que tienen sus hermanas XX (Burgoyne & Baker, 1985).

La disminución en la cantidad de ovocitos también es un hecho que se observa en ratones que presentan uno de sus cromosomas X con una gran inversión, la explicación del acortamiento en la vida reproductiva de los ratones XO (Lyon & Hawker, 1973) podría ser la disminución observada en el número de ovocitos. Esta disminución está ocasionada por el alto grado de atresia folicular debido probablemente al apareamiento incompleto del cromosoma X en paquitene (Burgoyne & Baker, 1985).

Sin embargo en *A. azarae* no se ha observado una disminución en el tamaño de camada de las hembras Xx ni tampoco una reducción en la longitud de la vida reproductiva, sino por el contrario las hembras Xx se han mostrado mejores reproductivamente.

Las investigaciones sobre las relaciones entre la fertilidad y las anormalidades cromosómicas se han hecho importantes, especialmente en ratón, desde la adaptación de las técnicas de extendidos para meiocitos en estadios de cigotene, paquitene y diplotene, que permitieron su estudio a nivel ultraestructural por microscopía electrónica.

Probablemente en *A. azarae* Xx exista algún mecanismo que compense la falta de gran parte del cromosoma X (o todo él de tratarse de hembras XY) durante la meiosis y este mecanismo actúe en la ovogénesis de *A. azarae* Xx en diferente forma que en *Mus* XO. Muy probablemente este mecanismo sea la autosinapsis como ha discutido Solari et al. (1989).

Para comprender la discrepancia entre los datos observados sobre el rendimiento reproductivo de hembras Xx y lo que cabría esperar de acuerdo a lo expuesto anteriormente se deberá recurrir a evidencias más directas. Evidencias más directas pueden ser obtenidas a partir de secciones histológicas tomadas justo antes o poco después del nacimiento de las hembras y contar el número de ovocitos aplicando técnicas cuantitativas de la histología de ovarios (De Boer & Jong, 1989). En *A. azarae* se ha iniciado el estudio de la histología de los ovarios de hembras XX y Xx, por el momento se sabe que existen dos tipos de ovarios claramente distinguibles por su diferente grado de atresia folicular (Solari, com. pers.).

La secuencia de 35 Kb, descubierta en 1990 por Sinclair et al. (gen SRY, región determinante del sexo) en el cromosoma Y humano planteó la posibilidad de que la determinación del sexo en el hombre se inicie en el gen SRY y continúe con una cascada de genes regulatorios (McLaren, 1990). Los avances realizados en este tema en humanos lejos de ser el final del problema constituyen el comienzo del conocimiento de la genética de la determinación del sexo en los mamíferos.

Como se ha mencionado las hembras **A. azarae** portadoras de un par de cromosomas sexuales heteromórfico fueron interpretadas como hembras que poseían un cromosoma X deleciónado. Sin embargo la posibilidad de que dichas hembras, portadoras de un par de cromosomas sexuales heteromórfico fueran XY no puede descartarse con los datos publicados hasta ahora. La suposición de una gran deleción del cromosoma X ha sido discutida (Fredga, 1983) y la imposibilidad de descartar la hipótesis XY para las hembras **A. azarae** heteromórficas mediante métodos citogenéticos (Lizarralde et al., 1982), ha conducido a la utilización de sondas de ADN derivadas del cromosoma Y humano intentando demostrar la identidad de ese pequeño cromosoma presente en las hembras heteromórficas (Bianchi et al., 1989).

Pero la discusión acerca de si se trata de un cromosoma X con una gran deleción o de un cromosoma Y no ha concluido definitivamente. El polimorfismo de cromosomas sexuales en **Akodon azarae** continua siendo motivo de debate, ya que durante la profase meiótica de hembras Xx la razón de la longitud de los elementos X y x es significativamente menor que la que hay entre los elementos X e Y de los machos, además la localización del cinetocoro, la ocurrencia de sinapsis y autosinapsis han evidenciado un comportamiento claramente diferente entre el par Xx de las hembras y el par XY de los machos (Solari et al., 1989).

El origen del elemento pequeño, que citológicamente en metafases somáticas es indistinguible del cromosoma Y, que acompaña al cromosoma X en las hembras heteromórficas, excedió los límites de esta investigación, por lo cual se ha adoptado la nomenclatura Xx para las hembras heteromórficas sin descartar totalmente la posibilidad de que se trate de un cromosoma Y. Pero probablemente de tratarse de un cromosoma Y originalmente, habría perdido él o los genes responsables de desencadenar la cascada de eventos conducentes a la formación de testículos. Muy probablemente sería deficiente para el gen correspondiente al SRY hallado en humanos. Si las hembras *A. azarae* Xx fueran en realidad XY hay dos orígenes posibles para explicar el fenotipo femenino.

La primera es suponer que en la meiosis del macho, el gen correspondiente al SRY humano (llamémoslo *sry(az)*) se haya traslocado al X. Esta traslocación conduciría a la formación de gametas X ^{*sry(az)*} y gametas con el Y* deficiente. La descendencia de un macho con dicha mutación, cruzado con una hembra XX "normal" daría origen a machos cuyo sexo fenotípico no estaría de acuerdo con su sexo citogenético, es decir serían machos ^{*sry(az)*} XX y hembras también cuyo sexo fenotípico sería el contrario al citogenético, es decir hembras XY*. Estas hembras XY* corresponderían a las que en este trabajo hemos denominado Xx. Si estas hembras XY* fueran fértiles, al ser cruzadas con un macho XY "normal", dejarían una descendencia formada por hembras

XX, XY*, machos XY y cigotas YY* (inviabiles).

La segunda posibilidad, sobre el origen de las hembras heterogaméticas es que un macho XY, en su gametogénesis haya perdido (por mutación o delección) el gen *sry*(az), sin haberlo traslocado al X ni a ningún autosoma. Habría sido en este caso una mutación conducente a la formación de gametas X y gametas con el Y* (mutado). Apareándose con una hembra XX "normal" su descendencia estaría formada sólo por hembras XX y XY*. Estas hembras XY* por cruzamiento con machos XY "normales" dejarían en la descendencia hembras XX, XY*, machos XY y cigotas YY* (inviabiles).

La única diferencia entre ambas situaciones es que si se tratara de una traslocación del *sry*(az) al X, esto ocurriría con cierta frecuencia con lo cual habría que poder encontrar machos *sry*(az) XX, lo que nos indicaría que hembras XY* están apareciendo en las poblaciones naturales, también con dicha frecuencia. Lo cual no es muy improbable si dicho gen en esta especie estuviera tan cercano a la región "pseudautosómica" o de recombinación como lo está en humanos (Sinclair, 1990).

Si el origen de las hembras heteromórficas para el par sexual hubiera sido el de una mutación del Y, podría pensarse en un evento único más que en un evento recurrente. Y por otro lado estaría más de acuerdo con el hecho de que en especies relacionadas, aparecen hembras heterogaméticas. Se habría fijado por no significar un deterioro en la reproducción de estas

posibles hembras XY*.

Sin dejar de ser especulativo el posible origen mencionado para las hembras heterogaméticas en *A. azarae*, plantea la necesidad de buscar machos XX^{sry(az)}, y de hallarlos analizar su frecuencia.

Para comprender cabalmente el modelo sería necesario conocer en profundidad los mecanismos de regulación de la población porque el destino de los cromosomas sexuales dependerán de la densidad de las poblaciones.

Debido a que hay cierto número de especies de mamíferos con mecanismos de determinación del sexo complicados o desconocidos, y poco se sabe sobre el origen y evolución de los mecanismos sexuales cromosómicos este trabajo ha intentado esclarecer algunos aspectos de la determinación del sexo en *Akodon azarae*.

Chaué Susaku

Mr Espinosa

BIBLIOGRAFIA

- Apfelbaum L., Liascovich R., Reig O.A. (1988). Relaciones citogenéticas y genético-alozimicas entre roedores akodontinos (Cricetidae, Sigmodontinae). V Reunión Iberoamericana de Conservación y Zoología de Vertebrados Simposio de evolución de Vertebrados. Montevideo, Uruguay.
- Barlow J.C. (1969). Observations on the biology of rodents in Uruguay. Life Sciences Contribution of Royal Ontario Museum. 75: 1-59.
- Baron E. (1939). Aspiration for removal of biopsy material from the liver; Report of 35 cases. Arch. Intern. Med., 63: 276-289.
- Berstein R., Koo G.C. & Wachtel, S.S. (1980). Abnormality of the X chromosome in human 46, XY female siblings with dysgenetic ovaries. Science 207: 768-769.
- Bianchi N.O. (1973). Consideraciones sobre los mecanismos de determinación sexual en los mamíferos. Medicina 33: 563-570.

Bianchi N.O. & Contreras J.R. (1967). The chromosomes of the field mouse **Akodon azarae** (Cricetidae-Rodentia) with special reference to sex chromosome anomalies. Cytogenet., 6: 306-313.

Bianchi N.O., Dulout F.N. & Contreras J.R. (1968). Sex chromosome replication and sex chromatin in **Akodon azarae** (Rodentia, Cricetidae). Theor. Appl. Genet., 38: 343-347.

Bianchi N.O., Contreras J.R. & Dulout F.N. (1969). Intraspecies autosomal polymorphism and chromosome replication in **Akodon molinae** (Rodentia, Cricetidae). Canadian J. Genet. Cytol., 11: 233-242.

Bianchi N.O., Reig O.A., Molina O.J. & Dulout F.N. (1971). Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). I- A progress report of Argentinian and Venezuelan forms. Evolution, 25: 724-736.

Bianchi N.O., Vidal Rioja L. & Bianchi M.S. (1976). Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). II- Interspecific homology of G-banding patterns. Cytologia, 41: 139-144.

Bianchi N.O., Merani S., Larramendy M., Lizarralde M. & Oliveira O. (1979). Cytogenetics of South American Akodont rodents (Cricetidae). V- Segregation of chromosome N 1 polymorphism in **Akodon moliane**. Experientia, 35: 1438-1439.

Bianchi N.O. & Merani M.S. (1980). Chromosome I polymorphism and viability in **Akodon** (Rodentia, Cricetidae). En *Ecología y genética de la especiación animal*. Equinoccio: 211-238. Universidad S.Bolivar, Ed O.A. Reig, Caracas.

Bianchi N.O. & Merani S. (1984). Cytogenetics of South American Akodont rodents (Cricetidae). X- Karyological distances at generic and intergeneric levels. J. of Mam. 65: 206-219.

Bianchi N.O., de la Chapelle A., Vidal Rioja L. & Merani M.S. (1989). The sex-determining zinc-finger sequences in XY females of **Akodon azarae** (Rodentia, cricetidae). Cytogenet. Cell. Genet., 52: 162-166.

Bianchi N.O. Sex determination in mammals. How many genes are involved? Biology of Reproduction. (1990, en prensa).

- Breeuwsma A.J. (1970). Studies on intersexuality in pigs.
Rotterdam: Drukkerij Bronder, offset.
- Bull J.J. (1983). Evolution of Sex Determining Mechanisms. The Benjamin/Cummings, Publusing Company, inc. California. 297 pp.
- Bull J.J. (1985). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. Experientia, 41: 1285-1296.
- Bull J.J. & Bulmer M.G. (1981). The evolution of XY females in mammals. Heredity, 47: 327-365.
- Bulmer M. (1988). Sex ratio evolution in lemmings. Heredity, 61: 231-233.
- Burgoyne P.S. & Biggers J.D. (1976). The consequences of X-dosage deficiency in the germ line: Impaired development "in vitro" of preimplantation embryos from XO mice. Devel. Biol., 51: 109-117.

- Burgoyne P.S. & Baker T.G. (1981). Oocyte depletion in XO mice and their XX sibs from 12 to 200 days post partum. J. Reprod. Fertil., 61: 207-212.
- Burgoyne P.S. & Baker T.G. (1985). Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. J. Reprod. Fertil., 75: 633-645.
- Cabrera A. (1961). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Rev. Mus. Arg. Cs. Nat., Cs. Zool. IV.
- Carballal G., Videla C.M. & Merani M.S. (1988). Epidemiology of Argentine Hemorrhagic fever. Eur. J. Epidemiol., 259-274.
- Caughley G. (1977). Analysis of vertebrate populations. J. Wiley & sons, London.
- Cooper D.W., Johnston P.G., Murtagh C.E., Sharman G.B., VandeBerg J.L., Poole W.E. (1975). Sex linked isozymes and sex chromosome evolution and inactivation in kangaroos. En Markert C.L. (ed.): "Isozymes, Vol. III Developmental Biology" N.Y.: Academic Press, pp. 559-573.

Crespo J. A. (1966). Ecología de una comunidad de roedores silvestres en el Partido de Rojas, Provincia de Buenos Aires. Rev. Mus. Arg. Cs. Nat., Ecología 1: 79-134.

Crespo J. A., Sabattini M. S., Piantanida M. J. & De Villafañe G. (1970). Estudios ecológicos sobre roedores silvestres. Ministerio de Bienestar social Sec. Est. de Salud Pública, pág.: 1-45

De Boer P. & de Jong J.H. (1989). "Chromosome pairing and fertility in mice". Chapter 2 in: Fertility and Chromosome pairing: Recent studies in Plants and Animals. C.B. Gillies ed. CRC, Press.

De Boer P. & Searle A.G. (1980). Summary and synthesis. Workshop on chromosomal aspects of male sterility in mammals. J. Reprod. Fertil., (60): 257

De Villafañe G. (1981). Reproducción y crecimiento de **Akodon azarae** (Fisher, 1829). Hist. Nat., 1 (28): 193-204.

Edwards R.G. & Gates A.H. (1959). Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. J. Endocrin., 18: 292-304.

Edwards R.G. (1962). Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. Nature, 196: 446-450.

Falconer, D.S. (1960). Introduction to quantitative genetics. Oliver & Boyd, Edinburgo. Capítulos 7-10.

Festing M.F.W. (1976). Hamsters. In: The UFAW Handbook on the care and Management of Laboratory Animals 5th ed. Churchill Livingstone, Edinburgo.

Fowler R.E. & Edwards R.G. (1957). Induction of superovulation and pregnancy in nature mice by gonadotrophins. J. Endocrinol., 15: 377-384.

Frank F. (1966). Verschiebung des geschlechts verhältnisses in der Wühlmaus-gruppe (Microtidae). Naturwissenschaften, 53: 90.

- Fredga K. (1983). Aberrant sex chromosome mechanisms in mammals. Evolutionary aspects. Differentiation, 23(suppl): 523-530.
- Fredga K. (1988). Aberrant chromosomal sex-determinaing mechanisms in mammals, with special reference to species with XY females. Phil. Trans. Roy. Soc. London. B., 322: 83-95.
- Fredga K., Gropp A., Winking H. & Frank F. (1976). Fertile XX-and XY-type females in the wood lemming **Myopus schisticolor**, Nature, 261: 225-227.
- Fredga K., Gropp A., Winking H. & Frank F. (1977). A Hypothesis explaining the exceptional sex ratio in the wood lemming (**Myopus schisticolor**). Hereditas, 85: 101-104.
- Gallardo M.H. (1982). Chromosomal homology in Southern **Akodon**. Experientia, 38: 1485-1487.
- Gileva E.A. (1983). A contrasted pattern of chromosome evolution in two genera of lemmings, **Lemmus** and **Dicrostonyx**. Genetica, 60: 173-179.

Gileva E. (1987). Meiotic drive in the sex chromosome system of the varying lemming **Dicrostonyx torquatus** Pall. (Rodentia, Microtinae). Heredity, 59: 383-389.

Gileva E.A. & Chebotar N.A. (1979). Fertile XO males and females in the varying Lemming **Dicrostomyx torquatus** Pall. (1779). A unique genetic system of sex determination. Heredity, 42 (1): 67-77.

Gileva E.A., Benenson I.E., Konopisteva L.A., Puchkov V.F. & Makaranets I. A. (1982). XO females in varying lemming **Dicrostonyx torquatus**: Reproductive performance and its evolutionary significance. Evolution, 36(3): 601-609.

Gropp A., Winking H., Frank F., Noack G. & Fredga K. (1976). Sex-chromosome aberrations in wood lemmings (**Myopus schsticolor**). Cytogenet. Cell. Genet., 17: 353-358.

Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. & Lovell-Badge R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346: 245-250.

- Gubernick D.J. (1988). Reproduction in the California mouse, *Peromyscus californicus*. J. Mamm., 69 (4): 857-860.
- Gwatkin R.B.L. (1977). Fertilization Mechanisms in Man and Mammals. Plenum Press, New York.
- Hamerton J.L., Dikson J.M., Pollard C.E., Grieves S.A. & Short R.V. (1969). Genetic intersexuality in goats. J. Reprod. Fert. 7 (suppl.): 25-51
- Henderson S.A. & Edwards R.G. (1968). Chiasma frequency and maternal age in mammals. Nature, 218: 22-28.
- Herbst E.W., Fredga K., Frank F., Winking H. & Gropp A. (1978). Cytological identification of two X-chromosome types in the wood lemming (*Myopus schisticolor*). Chromosoma (Berl), 69: 185-191.
- Hershkovitz P. (1966). Mice, land bridges and Latin American faunal interchange. En: Ectoparasites of Panama. Wenzel, R.L. and Tripton V.J. ed. Field Museum of Natural History, Chicago.: 725-751.

Hodara V.L. (1987). Cricétidos involucrados en la transmisión del virus Junin: su biología en condiciones de laboratorio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. 109 pp.

Hodara V.L., Kajon A.E., Quintans C., Montoro L. & Merani M.S. (1984). Parametros métricos y reproductivos de **Calomys musculinus** (Thomas, 1913) y **Calomys callidus** (Thomas, 1916) (Rodentia, Cricetidae). Revista del Museo Argentino de Ciencias naturales "Bernardino Rivadavia", 13: 453-459.

Hodara V.L., Espinosa M.B., Merani M.S. & Quintans C. (1989). **Calomys laucha** (Rodentia-Cricetidae): Growth and breeding in laboratory conditions. Laboratory Animals, 23: 340-344.

Hodgkin J. (1988). Right gene, Wrong Chromosome. Nature, 336: 712.

Iversen P. & Roholm K. (1939). On aspiration biopsy of the liver with remarks on its diagnostic significance. Acta Med. Scand., 102: 1-16.

Jacobs P.S. & Strong J.A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature,

183: 302-303.

Justines G. & Johnson K.M. (1970). Observations on the laboratory breeding of the cricetine rodent **Calomys callosus**. Lab. Anim. Care, 20: 57-60.

Kalela O. (1961). Seasonal change of habitat in the Norwegian lemming, **Lemmus lemmus** (L.). Ann. Acad. Scient. Fenn. A. IV 55: 1-72.

Kalela O. & Oksala T. (1966). Sex ratio in the Wood lemming **Myopus schisticolor** (Lillke.) in nature and captivity. Ann Univ. Turkei Series A II, 37: 1-24.

Kaufman M.H. (1973). Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies at conception in the mouse. J. Reprod. Fert., 35: 67-72.

Kent M.G., Schoffner R.N., Hunter A., Elliston K.O., Schroder W., Tolley E. & Wachtel S.S. (1988). XY sex reversal syndrome in the mare: clinical and behavioral studies, H-Y phenotype. Hum. Genet., 79: 321-328.

- King J.A. (1963). Maternal behavior in mammals. Ed. Rheingold, H.L. Wiley & sons, N.Y.
- Koopman P., Gubbay J., Colignon J. & Lovell-Badge R. (1989). Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. Nature, 342: 940-942.
- Koss L.G., Woyke S. & Oszewski W. (1988). Biopsia por aspiración. Interpretación citológica y bases histológicas. Ed. Med. Panam.
- Kruckenberg S. M., Gier H. T. & Dennis S. M. (1973). Post-natal development of the prairie vole **Microtus ochrogaster**. Lab. Anim. Sc., 23 (1): 53-55.
- Lee C. H. & Horvath D.J. (1969). Management of the meadow vole **Microtus pennsylvanicus**. Lab. Anim. Sc., 19 (1): 88-91.
- Liascovich R.C. (1991). Cariosistemática y evolución cromosómica en roedores akodontinos (Rodentia-Muroidea). Tesis doctoral. Facultad de ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 195 pp

- Liascovich R.C., Barquez R.M. & Reig O.A. (1989). A karyological and morphological reassessment of **Akodon (Abrothrix) illuteus** Thomas. J. Mamm., 70 (2): 386-391.
- Lidicker W.Z. (1973). Regulation of members in an island population of the California vole, a problem in community dynamics. Ecol. Monogr., 43: 271-302.
- Lizarralde M.S., Bianchi N.O. & Merani M.S. (1982). Cytogenetics of South American Akodont Rodent (Cricetidae). VII Origin of sex chromosome polymorphism in **Akodon azarae**. Cytolog., 47: 183-193.
- Lobato L., Cantos G., Araujo B., Bianchi N.O. & Merani M.S. (1982). Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae) X: **Akodon mollis**: a species with XY females and B chromosomes. Genetica, 57: 199-205.
- Lyon M.F. (1961). Gene action in the X Chromosome of the mouse (**Mus musculus**). Nature 190: 372-373.
- Lyon M.F. & Hawker S.G. (1973). Reproductive lifespan in irradiated and unirradiated chromosomally XO mice. Genet.

Res., 21: 185-194.

Malcolm J.R., Brooks R.J. & Bogart J.P. (1986). Chromosomes and sex ratio of the collared lemming, **Dicrostomys richardsoni**. Can. J. Zool., 64: 11-15.

Marston J.H. (1976). The Mongolian Gerbil. In: The UFAW handbook on the care and management of Laboratory Animals, 5 th ed. pp 263-275. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Matthey R. (1958). Un nouveau type de détermination chromosomique du sexe chez les mammifères **Ellobius lutescens** Th et **Microtus (Chilotus) oregoni** Bachm. (Muridés-Microtinés). Experientia 14: 240-241.

McLaren A., Simpson E., Tomonari K., Chandler P. & Hogg H. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. Nature 312: 552-555.

McLaren A. (1990). What makes a man a man?. Nature 346: 216-217.

Mello D. A. (1978). Biology of **Calomys callosus** (Renger, 1830)

- under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae). Rev. Bras. Biol., 38 (4): 807-811.
- Mello D.A. & Mathias C.H. (1987). Criasao de **Akodon arviculoides** (Rodentia, Cricetidae) em laboratorio. Rev. Brasil. Biol., 47: 419-423.
- Merani M.S. & Lizarralde M. (1980). **Akodon molinae** (Rodentia-Cricetidae) a new laboratory animal: breeding, management and reproductive performance. Laboratory Animals, 14: 129-131.
- Monk M. & McLaren A. (1981). X.Chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. J. Embriol. Exp. Morph., 63: 75-84.
- Montoro L.S., Quintans C.J., Tancredi A.M., Donaldson M. & Hodara V.L. (1987). **Calomys musculus** (Rodentia-Cricetidae) Its reproduction in captivity. Laboratory animal studies in the Quest of Health and Knowledge. Lab. Anim. Science. Sociedade Brasileira de Genética: 303-308.
- Moore W. (1965). Observations on the breeding and care of the chinese hamster, **Crisetulus griseus**. Lab. Anim. Sc., 15 (1): 94-101.

Neal P. & Baker T.G. (1973). Response of mouse ovaries "in vivo" and organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. I. Examination of critical time intervals. J. Reprod. Fert., 33: 399-410.

Ohno S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer-Verlag. Berlin 192 pp.

Ohno S. (1979). Major sex-determining genes. Springer-Verlag Berlin. 139 pp.

Ohno S., Jainchill J., & Stenius C. (1963). The creeping vole (*Microtus oregoni*) as a gonosomic mosaic. I. The OY/XY constitution of the male. Cytogenetics 2: 232-239.

Ohno S., Becak W. & Becak M.L. (1964). X- autosome ratio and the behavior pattern of individual X-Chromosomes in placental mammals. Chromosoma, Berl., 15: 14-30.

Ohno S., Stenius C. & Christian L. (1966). The XO as the normal female of the creeping vole (*Microtus oregoni*). In

Chromosomes today (ed. C.D. Darlington & K.R. Lewis), vol. 1: 182-187. Edinburgh and London: Oliver and Boyd.

Page D.C. (1988). Is ZFY the sex-determining gene on the human Y chromosome? Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 322: 155-157.

Page D.C., Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M.C., Mardon G., Pollack J., Mc Gilliuray B., de la Chapelle A. & Brown L.G. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell., 51: 1091-1104.

Palmer M.S., Sinclair A.H., Berta P., Ellis N.A., Goodfellow P.N., Abbas N.E. & Fellous M. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. Nature, 342: 937-939.

Parkes A. S. (1976). Patterns of sexuality and reproduction. Oxford. University Press, London.

Pearson O.P. (1967). La estructura por edades de la dinámica reproductiva de una población de roedores de campo, **Akodon azarae**. Physis, 27: 53-58.

- Rafferty K.A. (1970). Methods in experimental embryology of the mouse. ed John Hopkins, Londres.
- Rao S.R., Vasantha K., Thelma B.K., Juyal R.C. & Jhanwar S.C. (1983). Heterochromatin variation and sex chromosome polymorphism in **Nesokia indica**: a population study. Cytogenet. Cell. Genet. 35: 233-237.
- Rausch R.L. & Rausch V.R. (1972). Observations on chromosomes of **Dicrostonyx torquatus stevensoni** Welson and chromosomal diversity in varying lemmings. Z. Saugetierkunde 37: 372-382.
- Reig O.A. (1964). Roedores y Marsupiales del Partido de General Pueyrredón y regiones adyacentes (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Publ. Mus. Mun.Cs. Nat., Mar del Plata. 1: 203-224.
- Reig O.A. (1980). A new fossil genus of South American cricetid roedents allied to **Wiedomys** with an assessment of the sigmodontinae. J.Zool., 192: 257-281.

- Reig O.A. (1981). Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. Monografie Naturae, Pub. Mus. Mun. Cs.Nat. "Lorenzo Scaglia", 1: 1-161.
- Reig O.A. (1984). Distribución geográfica e historia evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae-Sigmodontinae). Rev. Bras. Genet., VII,2: 333-365.
- Reig O.A. (1986). Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. En: F. Vuilleumier & M. Monasterio (eds), "High Altitude Tropical Biogeography": 404-439. Oxford University Press.
- Reig O.A. (1987). An assessment of the systematics and evolution of the akodontini, with the description of new fossil species of Akodon (Cricetidae, Sigmodontinae). Fieldiana Zoology (N.S.), 39: 347-399.
- Reig O.A., Olivo N. & Kiblicky P. (1971). The idiogram of the Venezuelan vole mouse, **Akodon urichi venezuelensis** Allen (Rodentia, Cricetidae). Cytogenetics, 10: 99-114.

Richmond M. & Conoway H. (1969). Management, breeding and reproductive performance of the vole, **Microtus ochrogaster** in laboratory colony. Lab. Anim. Sc. 19 (1): 80-87.

Rodriguez M., Montoya R. & Venegas W. (1983). Cytogenetic analisis of some chilean species of the genus **Akodon** Meyan (Rodentia-Cricetidae). Caryologia, 36: 129-138.

Roldan E.R.S., Acuña A.M., Vercellini O., Horgan C. & Merani M.S. (1984). Parámetros reproductivos de Akodon molinae Contreras 1968, Akodon dolores Thomas 1916 y sus híbridos (Rodentia, Cricetidae). Rev. Mus. Cs. Nat. "Bernardino Rivadavia", Zool., XIII (51): 485-490.

Roldan E.R.S., Vitullo A.D., Merani M.S. & Von Lawzewitsch I. (1985). Cross fertilization in vivo and in vitro between three species of Vesper mice **Calomys** (Rodentia, Cricetidae). J. Exp. Zool., 233: 433-442.

Roldan E.R.S., Toshitaka H. & Yanagimachi R. (1987). Superovulation in immature and mature chinese hamsters. Gamete Research, 16: 281-290.

Rugh R. (1968). The Mouse. Its reproduction and development.

Mineapolis: Burgess Publishing Co.

Sabattini M.S., Gonzalez del Rios L.E., Diaz G. & Vega V.R.
(1977). Infección natural y experimental de roedores con
virus Junín. Medicina, 37: 149-161.

Saez F.A. & Cardoso H. (1978). Citogenética básica y biología de
los cromosomas. Secretaría general de la OEA, Washington DC,
124 pp.

Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human
chromosomes. Lancet, 2: 971-972.

Selden J.R., Wachtel S., Koo G.C., Haskins M.E. & Patterson D.F.
(1978). Genetic basis of XX male syndrome and XX true
hermaphroditism: evidence in the dog. Science (Wash. 201:
644-646.

Sinclair A.H., Foster J.W., Spencer J.A., Page D.C., Palmer M.,
Goodfellow P.N. & Marshall-Graves J.A. (1988). Sequences
homologous to ZFY, a candidate human sex- determining gene,
are autosomal in marsupials. Nature, 336: 780-783.

Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins R.J., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R. & Goodfellow P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 346: 240-244.

Sokal R.R. & Rohlf F.J. (1979). Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, 443 pp.

Solari A.J. (1974). The behavior of the XY pair in mammals. Int. Rev. Cytol., 38: 273-317.

Solari A.J. (1989). Sex chromosome pairing and fertility in the heterogametic sex of mammals and birds. Chapter 3 in: Fertility and chromosome pairing: Recent studies in plants and animals. C.B. Gillies ed. CRC, Press.

Solari A.J., Espinosa M.B., Vitullo A.D., Merani M.S. (1989). Meiotic behavior of gnosomically variant females of Akodon azarae (Rodentia, Cricetidae). Cytogenet. Cell. Genetics., 52: 57-61.

- Stevens N.M. (1905). Studies in spermatogenesis with special reference to the "accessory chromosome". Carneg. Inst. Wash., publ. 36, Washington, D.C.
- Summer A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res., 75: 304-306.
- Tarkowski A.K. (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenet., 5: 394-400.
- Tsuchida W.S. & Uchida I.A. (1975). Radiation-induced chromosome aberrations in mouse spermatocytes and oocytes. Cytogenet. Cell. Genet., 14: 1-8.
- Verma R.S. & Babu A. (1989). Human chromosomes. Manual of basic techniques. Pergamon Press, 240 pp.
- Vitullo A.D., Merani M.S., Reig O.A., Kajon A.E., Scaglia O. & Espinosa M.B. (1986). Cytogenetics of South American Akodont rodents (Cricetidae): New karyotypes and chromosmae banding patterns of argentinian and uruguayan forms. J. Mamm., 67: 69-80.

Vitullo A.D., Hodara V.L. & Merani M.S. (1987). Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculus*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 37(3): 663-669.

Vitullo A.D. & Merani M.S. (1988). Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in nature?. J. Gen. Virol., 69: 1437-1440.

Vogel W., Steinbach P., Djalali M., Mehnert K., Ali S., & Epplen J.T. (1988). Chromosome 9 of *Ellobius lutescens* is the X chromosome. Chromosoma 96: 112-118.

Wilson E.B. (1905). Studies on chromosomes. II The paired microchromosome idiochromosome, and heterotrophic chromosomes in Hemiptera. J. Exp. Zool., 2: 507-545.

Wilson E.D. & Zarrow M.X. (1962). Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. J. Reprod. Fert., 3: 148-158.

Wilson M., Daly M. & Behrends P. (1985). The estrous cycle of two species of kangaroo rats (*Dipodomys microps* and *D. merriami*). J. Mamm., 66(4): 726-732.

Winking H., Gropp A. & Fredga K. (1981). Sex determination and phenotype in "wood lemmings" with XXY and related karyotypic anomalies. Human Genet. 58: 98-104.

Yanagimachi R. & Chang M.C. (1964). In vitro fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool., 156: 361-378.

Yanagimachi R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. J. Reprod. Fert., 18: 275-286.

Yonenaga Y. (1979) New karyotypes and somatic and germ-cell banding in *Akodon arviculoides* (Rodentia-Cricetidae). Cytogenet. Cell Genetics, 23: 241-249.

Zuckerman S. (1960). "Sex Differentiation and Development", edited by Austin, C.R. (Camb. Univ. Press).

Zuleta G.A., Kravetz F.O., Busch M. & Percich R.E. (1988). Dinámica poblacional del ratón del pastizal pampeano (*Akodon azarae*) en ecosistemas agrarios de Argentina. Rev. Chilena Hist. Nat., 61: 231-244.

Zuleta G.A. (1989). Estrategias de historia de vida en el ratón de pastizal pampeano, **Akodon azarae**. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 161 pp.

Zuleta G.A. & Vignau M.L. (1990). Bot fly parasitism (**Rogenhoferia bonaerensis**) (Diptera, Cuterebridae) in the pampean grassland mouse (**Akodon azarae**), in Argentina. J.Wildl. Dis., 26(1): 11-17.